

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Caractérisation du rôle de la protéine membranaire interne mitochondriale mpv17 dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses

Nguyen, Thuy

*Award date:*  
2018

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**Faculté des Sciences**

**CARACTERISATION DU ROLE DE LA PROTEINE MITOCHONDRIALE MPV17  
DANS LE CONTROLE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES  
CANCEREUSES**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Thuy NGUYEN

Janvier 2018



**Université de Namur**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

## **Caractérisation du rôle de la protéine membranaire interne mitochondriale mpv17 dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses**

NGUYEN Thuy

### Résumé

MPV17 est une protéine membranaire interne mitochondriale connue pour être impliquée dans le maintien de l'ADN de la mitochondrie (ADNmt) par un mécanisme encore mal connu et dont la déficience provoque des troubles associés à une déplétion de l'ADNmt. Cependant, dans les cellules prolifératives telles que les cellules cancéreuses, l'abondance de l'ADNmt ne semble pas être affectée par une déplétion de MPV17. De plus, une répression du gène MPV17 dans les cellules cancéreuses est associée à un phénotype de faible prolifération, suggérant que cette protéine est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses. Nous utilisons les résultats d'une analyse de séquençage de l'ARN pour rechercher les molécules et les mécanismes qui pourraient expliquer comment la protéine MPV17 contrôle cette fonction, en comparant les cellules de carcinome hépatocellulaire humaines Huh7 transduites avec shRNA ciblant MPV17 (shMPV17) avec des cellules transduites avec une séquence shRNA ne ciblant aucune séquence (shNT). TGF- $\beta$ 1 et ATF4 sont prédits comme des régulateurs majeurs (upstream regulators) des gènes différenciellement exprimés, et sont étudiés dans ce travail.

À côté de cette étude mécanistique, une lignée cellulaire dont la répression pour MPV17 est inducible est développée. Celle-ci est nécessaire en raison de la perte progressive du phénotype de faible prolifération observée dans les cellules Huh7 avec une répression constitutive de MPV17. L'utilisation d'un shRNA ciblant la séquence de MPV17 et dont l'expression est régulée par l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), utilisé comme agent inducteur, est optimisée.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

**Promoteur :** P. Renard

**Co-promoteur :** T. Arnould

## Remerciements

Après ces 10 mois les plus enrichissants de mes études, il est venu le temps des remerciements.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice et mon co-promoteur pour m'avoir permis d'exercer dans leur laboratoire et de réaliser ce travail. Je remercie particulièrement ma promotrice pour m'avoir appris la rigueur scientifique et à raisonner en tant que tel et pour tout le temps consacré à relire ce mémoire.

Je remercie infiniment Morgane pour tout ce qu'elle m'a appris et apporté durant ce mémoire. Je n'aurai pas pu espérer meilleure encadrante. Tu m'as beaucoup appris scientifiquement parlant et tu as toujours été disponible quand j'en avais besoin. Mais tu m'as aussi aidé à relativiser et pris la peine de me rassurer durant mes moments de panique. Merci pour tous ces moments à discuter, à apprendre mais aussi à rire. J'espère de tout cœur que tout se terminera bien pour toi. Je ne doute pas une seconde que tout le travail que tu fournis ne sera pas fait en vain. Mais surtout je te souhaite d'être heureuse, la chance tourne !

Je remercie les membres du laboratoire de l'URBC, des gens formidables et toujours prêts à répondre à mes 1001 questions : Antoine, Sophie, Kathleen, Martine, Guy, Maude, Émilie et bien d'autres encore.

Merci à mon jury, d'avoir pris le temps de lire ce mémoire.

Je remercie mes amies, Alison, Jia-Wei, Clotilde et Audrey pour tous ces moments de détente et d'entre-aide, mais aussi mes « collègues » de l'équipe DYSO Marie-Albane, Jérémy et Pauline. Merci pour tous les moments partagés à discuter et surtout à rire. Je suis heureuse d'avoir pu réaliser ce mémoire à vos côtés. Merci à Ben qui m'a été d'une aide sans faille même quand je devenais insupportable ou à fleur de peau. Tu m'as beaucoup aidé à garder les pieds sur terre tout en me changeant les idées lorsque c'était nécessaire.

Enfin, merci à mes parents qui ont toujours été présents et m'ont été d'un soutien sans faille. Merci de m'avoir permis de faire ces études et de m'y épanouir.

An (Thuy)



## **Tableau des abréviations**

ADNmt	ADN mitochondrial
AMH	Anti-Müllerian hormone
ANT1	Adenine-nucleotide translocator 1
AP-1	Activator protein 1
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codante
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adénosine triphosphate
BMP	Bone morphogenic protein
bZIP	Basic leucine zipper
C/EBP $\gamma$	CCAAT-enhancer-binding proteins gamma
CBP	CREB-Binding protein
CBS	Cystathionine $\beta$ -synthase
CDC25	Cell division cycle 25
CDK	Cyclin dependent kinase
CDK2AP1	CDK2 associated protein 1
CGL	Cystathionine gamma lyase
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CHOP-10	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
CKI	Cycline kinase inhibitor
CMV	Cytomégalovirus
Co-SMAD	Common-mediator SMAD
CREB	Cyclic AMP response element binding protein
dA	Déoxyadénosine
dAMP	Déoxyadénosine monophosphate
DAPK	Death-associated protein kinase
dC	Déoxycytidine
dCMP	Déoxycytosine monophosphate
dG	Déoxyguanosine
dGK	Déoxyguanosine kinase
dGMP	Déoxyguanosine monophosphate
dGTP	Déoxyguanosine triphosphate
DGUOK	Deoxyguanosine kinase
dNDP	Déoxynucléotide diphosphate
dNMP	Déoxynucléotide monophosphate
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
dTMP	Déoxythymidine monophosphate
dTTP	Déoxythymidine triphosphate
EGF	Epidermal growth factor
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic initiation factor 2 alpha
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E
eIF4F	Eukaryotic initiation factor 4F
eIF4G	Eukaryotic initiation factor 4G
ENT1	Equilibrative nucleoside transporter 1
Erk	Extracellular signal-regulated kinase

FoxO3	Forkhead box O3
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GADD45 $\beta$	Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 beta
GART	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase
GDH	Growth differentiation hormone
GFP	Green protein fluorescent
GSH	Glutathion forme réduite
HAT	Histones acétyltransférases
HDAC	histones déacétylases
HGF	Hepatocyte growth factor
IPA	Ingenuity pathway analysis
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
I-SMAD	SMAD Inhibitor
ISR	Integrated stress response
JNK	Jun N-terminal kinase
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MMP2	Matrix metalloproteinase 2
MMP3	Matrix metalloproteinase 3
MNK1	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1
mTOR	mammalian Target of rapamycin
mtSSB	mitochondrial single-strand DNA binding protein
NAC	N-acétylcystéine
NDPK	Nucleoside diphosphate kinase
ODC1	Ornithine decarboxylase 1
OXPPOS	Phosphorylation oxydative
p38MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinase
PAICS	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Pol $\gamma$	ADN polymérase gamma (protéine)
POLG	DNA polymerase gamma (gène)
POLG2	DNA polymerase gamma 2 accessory subunit
pRB	Protéine du rétinoblastome
rGMP	Riboguanosine monophosphate
rGTP	Riboguanosine triphosphate
RNaseH1	Ribonucléase H1
rNMP	Ribonucléotide triphosphate
RNA-Seq	Séquençage de l'ARN
ROS	Reactive oxygen species
RPPA	Reverse phase protein array
RR ou RNR	Ribonucleotide reductase
R-SMAD	Receptor-regulated SMAD
SARA	SMAD anchor for receptor activation
SBE	SMAD binding element
SCS	succinate CoA synthase



SDAM	Syndrome de Déplétion de l'ADN Mitochondrial
shMPV17	short hairpin MPV17
shNT	short hairpin non target
shRNA	short hairpin RNA
SYM1	Stress-induced yeast MPV17
TCGA	The cancer genome atlas
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TK2	Thymidine kinase 2
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
T $\beta$ RI	TGF- $\beta$ receptor type I
T $\beta$ RII	TGF- $\beta$ receptor type II
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
YCM1	Yeast mitochondrial carrier 1

## **Table des matières**

<b>I. Introduction .....</b>	<b>1</b>
1. La mitochondrie et les syndromes de déplétion de l'ADN mitochondrial.....	1
2. La protéine MPV17 .....	2
2.1 L'homologue de la protéine MPV17 chez la souris .....	2
2.2 L'homologue de la protéine MPV17 chez la levure : SYM1 .....	4
2.3 L'homologue de la protéine MPV17 chez le poisson zèbre.....	6
2.4 La protéine MPV17 chez l'humain .....	7
3. Résultats antérieurs obtenus au laboratoire .....	9
3.1 Analyse par RPPA d'acteurs associés au cycle cellulaire. ....	9
3.2 Analyse par séquençage de l'ARN.....	10
3.2.1 Diminution de l'expression d'ATF4.....	10
3.2.2 La voie de TGF- $\beta$ .....	11
4. Objectifs du mémoire .....	16
<b>II. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>17</b>
1. Culture cellulaire .....	17
2. Transduction lentivirale.....	17
2.1 Amplification du plasmide .....	17
2.2 Extraction et purification des plasmides amplifiés.....	18
2.3 Production de lentivirus.....	18
2.4 Détermination du titre de lentivirus.....	18
2.5 Transduction lentivirale.....	19
3. Test de l'adaptation des shRNA constitutifs .....	19
3.1 Test MTT.....	20
3.2 Dosage protéique de Folin.....	20
3.3 Temps de doublement .....	20
4. Optimisation des concentrations d'IPTG pour l'expression inductible de shMPV17 .....	21
4.1 Détermination de la concentration toxique de l'IPTG .....	21
4.2 Détermination de la concentration efficace de l'IPTG.....	21
5. Western Blot.....	22
5.1 Extraction protéique .....	22
5.2 Dosage protéique .....	22
5.3 Électrophorèse .....	22
5.4 Transfert des protéines sur membrane.....	23
5.5 Révélation des protéines.....	23
6. RT-PCR en temps réel.....	24
6.1 Extraction d'ARN .....	24
6.2 Transcription inverse.....	24
6.3 PCR en temps réel .....	25
7. Immunofluorescence .....	25
8. Transfection.....	26
9. Supplémentation au N-acétylcystéine .....	27
<b>III. Résultats.....</b>	<b>28</b>
<b>Partie I : Étude des mécanismes moléculaires par lesquels la diminution de la protéine MPV17 ralentit la prolifération des cellules cancéreuses.....</b>	<b>28</b>
1. Investigation de la voie des SMADs .....	28
1.1 TGF- $\beta$ .....	28
1.2 Évaluation de l'abondance et de la localisation des SMADs .....	28
1.3 Optimisation de la transfection des cellules Huh7 .....	29



## TABLES DES MATIÈRES

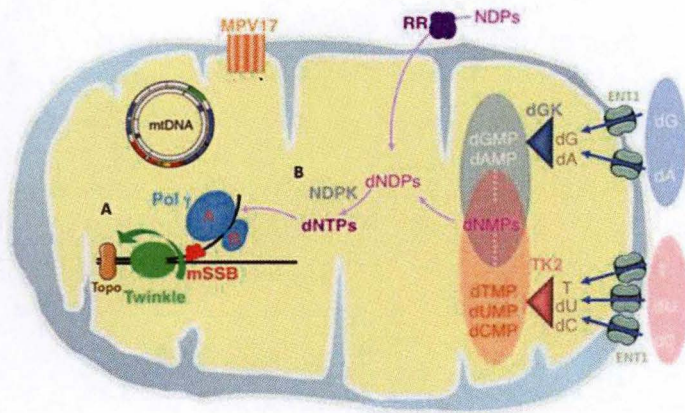
---

1.4	Evaluation de l'activité des SMADs dans les cellules Huh7 silencées pour MPV17 .....	30
2.	Tentative de restauration du phénotype prolifératif.....	30
<b>Partie II : Construction d'une lignée cellulaire silencée pour MPV17 de manière inductible .....</b>		<b>31</b>
1.	Efficacité du silençage de MPV17 en utilisant un shRNA constitutif.....	31
2.	Mise en évidence de la perte progressive du phénotype de faible prolifération avec un shMPV17 constitutif.....	31
3.	Développement d'une lignée cellulaire Huh7 au silençage de MPV17 inductible .....	32
3.1	Évaluation de la toxicité de l'IPTG.....	32
3.2	Évaluation de l'efficacité de l'IPTG.....	32
4.	Évaluation de la prolifération suite au silençage de MPV17 par un shMPV17 inductible.....	33
4.1	Utilisation d'une concentration de 0,05 mM d'IPTG pour induire le silençage de MPV17 .	33
4.2	Utilisation d'une concentration de 0,1 mM d'IPTG pour induire le silençage de MPV17 ...	34
5.	Comparaison entre un silençage de MPV17 par un shMPV17 constitutif et un shMPV17 inductible.....	35
5.1	Comparaison de la répression de la protéine MPV17 .....	36
5.2	Comparaison des effets d'un silençage de MPV17 sur des protéines précédemment étudiées et considérées comme étant impliquées dans le phénotype prolifératif de MPV17 .....	36
5.2.1	ATF4 .....	36
5.2.2	MNK1 .....	37
<b>IV. Discussion .....</b>		<b>38</b>
<b>V. Bibliographie .....</b>		<b>45</b>



# I. INTRODUCTION





**Figure 1. Réplication de l'ADNmt et maintien de la réserve de nucléotides mitochondriale.** (A) La machinerie de réplication de l'ADNmt est composée de l'ADN polymérase gamma (Pol  $\gamma$ ) spécifique à la mitochondrie, de l'hélicase ADNmt Twinkle, de l'ARN polymérase mitochondriale, d'une topoisomérase, de la ribonucléase H1 et de la protéine de liaison à l'ADN mtSSB. (Young and Copeland, 2016). (B) Le maintien de la réserve de déoxynucléotides triphosphates (dNTPs) mitochondriale est assuré par une synthèse des dNTPs qui peut se faire par deux voies ; la voie de novo ou la voie de sauvetage des nucléotides. Dans la voie mitochondriale de recyclage des nucléotides, les déoxynucléosides (dN) sont transportés via equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) du cytosol à la mitochondrie où ils sont phosphorylés en déoxynucléotides monophosphates (dNMPs) par les protéines déoxyguanosine kinase (dGK) et thymidine kinase 2 (TK2). La dGK synthétise du déoxyguanosine monophosphate (dGMP) et du déoxyadénosine monophosphate (dAMP) à partir de déoxyguanosine (dG) et de déoxyadénosine (dA), respectivement. La TK2 permet de synthétiser de la déoxythymidine monophosphate (dTMP) et déoxycytidine monophosphate (dCMP) à partir de thymidine et de déoxycytidine (dC), respectivement. Dans la voie *de novo* cytosolique, la synthèse de dNTPs à partir de nucléotides disphosphates (NDPs) dans le cytosol est catalysée par la ribonucléotide réductase (RR). Les dNDPs sont transportés dans la mitochondrie où ils sont phosphorylés en dNTPs par la nucléoside diphosphate kinase (NDPK) (Spinazzola et al., 2009).



## I. Introduction

### 1. La mitochondrie et les syndromes de déplétion de l'ADN mitochondrial

La mitochondrie est un organe présent dans toutes les cellules eucaryotes nucléées. Elle possède des origines bactériennes, ce qui explique certaines caractéristiques qui la distinguent des autres organites cellulaires. Ces caractéristiques sont, pour n'en citer que deux, un génome circulaire propre et une capacité à produire de l'adénosine triphosphate (ATP) par phosphorylation oxydative (OXPHOS). Cette symbiose entre l'ancêtre de la mitochondrie et l'ancêtre de la cellule nucléée a amené à la cellule eucaryote telle qu'on la connaît aujourd'hui. Au cours de l'évolution, des échanges entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial se sont déroulés, rendant les deux partenaires de cette symbiose totalement dépendant et indissociable l'un de l'autre (Friedman and Nunnari, 2014). En effet, il existe approximativement 1500 protéines mitochondriales dont seulement 13 sont codées par des gènes mitochondriaux. Ces 13 protéines sont toutes des sous-unités des complexes des OXPHOS mais les complexes de la chaîne respiratoire sont assemblés à partir de sous-unités codées par les deux génomes. Le génome mitochondrial contient 37 gènes dont 24 codent pour des ARN de transfert et des ARN ribosomiaux nécessaires à la synthèse des protéines (Young and Copeland, 2016). En plus de la production d'énergie sous forme d'ATP, la mitochondrie assure de nombreuses autres fonctions, telles que la régulation de l'apoptose, la synthèse des groupements hèmes et une contribution au cycle de l'urée. (McBride et al., 2006).

Ce lien qui existe entre la mitochondrie et le noyau cellulaire permet de comprendre comment des mutations dans des gènes mitochondriaux, mais également dans des gènes nucléaires, peuvent avoir un impact sur la morphologie, la physiologie et les fonctions de la mitochondrie et provoquer des maladies mitochondriales telles que les syndromes de déplétion de l'ADN mitochondrial (SDAM). Ces syndromes sont caractérisés par une réduction du contenu en ADN mitochondrial (ADNmt) allant de 90% à 95%, dans le muscle et le foie, respectivement (Wong et al., 2007). La déplétion en ADNmt peut se traduire par des manifestations physiologiques très diverses, telles qu'une défaillance du foie, une hypoglycémie et des lésions cérébrales multiples si les patients survivent à une insuffisance hépatique (Garone et al., 2012; Wong et al., 2007). Cette réduction de l'abondance de l'ADNmt est liée à des troubles dans la maintenance de l'ADNmt associés à des mutations de gènes nucléaires impliqués dans la réplication de l'ADNmt ou dans la synthèse des nucléotides (El-Hattab and Scaglia, 2013).

Le processus de réplication de l'ADNmt nécessite principalement l'ADN polymérase gamma (Pol  $\gamma$ ) spécifique à la mitochondrie, dont la sous-unité catalytique est codée par le gène *POLG* tandis que la sous-unité accessoire, codée par le gène *POLG2*, régule la processivité de l'enzyme. La machinerie de réplication est également composée de l'hélicase Twinkle, de l'ARN polymérase mitochondriale, d'une topoisomérase, de la ribonucléase H1 et de la protéine de liaison à l'ADN monocaténaire mitochondriale mtSSB (**Figure 1A**) (Young and Copeland, 2016). Il n'est donc pas étonnant de retrouver des mutations des gènes *POLG* et *POLG2* (Ferrari et al., 2005), *C10orf2* codant pour la protéine Twinkle (Hakonen et al., 2007), et *RNaseH1* codant pour la ribonucléase H1, chez différents patients atteints de SDAM.



La déplétion en ADNmt observée chez les patients atteints de SDAM peut être due à un dysfonctionnement dans le maintien du pool de nucléotides mitochondriaux ou dans la réplication de l'ADNmt (**Figure 1**). L'ADNmt est continuellement répliqué indépendamment des divisions cellulaires, contrairement à l'ADN nucléaire. L'approvisionnement de désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) mitochondrial est assuré par une synthèse des dNTPs qui peut se faire par deux voies ; la voie *de novo* ou la voie de sauvetage des nucléotides. La première est observée dans des cellules prolifératives et est basée sur l'importation mitochondriale des dNTPs synthétisés dans le cytosol. La seconde dépend du recyclage de déoxynucléosides pré-existants, pour synthétiser de nouveaux précurseurs d'ADN. Dans cette voie, les différents déoxynucléosides sont transportés via l'équilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) du cytosol à la mitochondrie. Une fois que les déoxynucléosides se trouvent dans la mitochondrie, ils sont phosphorylés en déoxynucléotides monophosphates (dNMPs) par les protéines déoxyguanosine kinase (dGK) et thymidine kinase 2 (TK2). La dGK synthétise du déoxyguanosine monophosphate (dGMP) et du déoxyadénosine monophosphate (dAMP) à partir de déoxyguanosine (dG) et de déoxyadénosine (dA), respectivement. La TK2, quant à elle, permet de synthétiser de la déoxythymidine monophosphate (dTMP) et déoxycytosine monophosphate (dCMP) à partir de thymidine et de déoxycytidine (dC) respectivement (Spinazzola et al., 2009) (**Figure 1**).

Ce sont des mutations de gènes nucléaires impliqués dans cette voie de recyclage qui peuvent être la cause de SDAM. Ainsi, une mutation des gènes *DGUOK*, qui code pour une dGK mitochondriale requis dans la voie de sauvetage des purines (Mandel et al., 2001), *TK2*, qui code pour une thymidine kinase mitochondriale essentielle pour la voie de sauvetage des pyrimidines (Saada et al., 2001), et *MPV17*, qui code pour une protéine de la membrane interne de la mitochondrie dont la fonction est mal connue (Spinazzola et al., 2006), ont été identifiées chez des patients atteints de SDAM.

## 2. La protéine MPV17

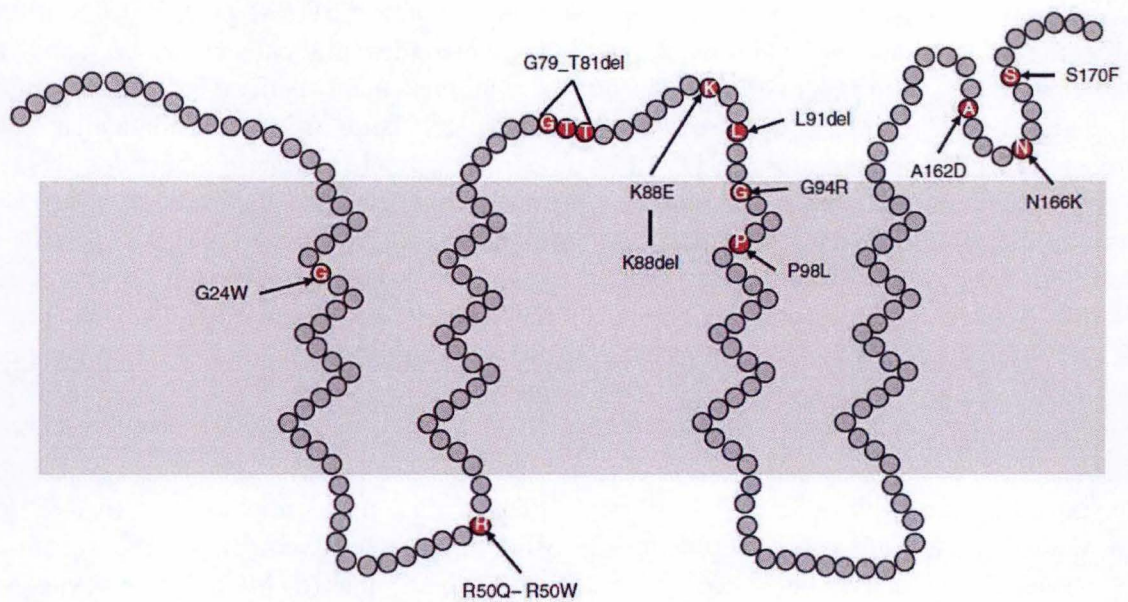
La protéine MPV17 possède des fonctions encore mal comprises. Une revue de la littérature publiée par Löllgen a récemment fait le point sur l'ensemble des connaissances sur la protéine MPV17 chez plusieurs modèles animaux. Nous en résumerons les principaux éléments principaux ci-dessous avant de détailler la protéine MPV17 humaine.

### 2.1 L'homologue de la protéine MPV17 chez la souris

Le gène MPV17 fut identifié pour la première fois chez la souris durant une étude de génération de lignées de souris mutantes utilisant la mutagenèse insertionnelle aléatoire à l'aide de rétrovirus recombinants (Weiher et al., 1990). En effet, l'introduction d'un rétrovirus mène à l'insertion de matériel génétique exogène dans le génome de la cellule hôte et peut avoir pour conséquence une perturbation d'un gène endogène et la création d'un phénotype particulier.

Ce fut le cas dans cette étude, où l'insertion du rétrovirus dans le génome des cellules souches embryonnaires de la souris a permis l'observation d'un phénotype de syndrome néphrotique (Weiher et al., 1990). Pour comprendre comment cette insertion rétrovirale a pu engendrer ce phénotype, l'identité des séquences nucléotidiques environnant le site d'insertion du rétrovirus fut investiguée. C'est ainsi que la découverte d'une séquence capable de transcrire un ARNm,





**Figure 2. Modèle de structure de la protéine MPV17 humaine.** La protéine MPV17 est composée de 176 acides aminés. Elle possède 4 domaines transmembranaires prédits et un site putatif de phosphorylation de protéine kinase C. Les flèches indiquent les positions et les mutations recensées de MPV17 à l'origine de SDAM (Löllgen and Weiher, 2015).



absent chez les souris qui présentent l'insertion virale dans le locus de MPV17, fut possible. Le gène *MPV17* code pour une protéine de 176 acides aminés faisant partie d'un complexe de 600kDa (Bottani et al., 2014) et présentant plusieurs régions hydrophobes indiquant que la protéine est membranaire (Weiher et al., 1990). Plus précisément, la protéine a été localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Spinazzola et al., 2006). La recherche de l'homologue humain pour *MPV17* a révélé la présence d'un gène chez l'homme ayant une séquence possédant 92% d'identité avec le gène *MPV17* murin (Weiher et al., 1990), suggérant que ce gène a été conservé durant l'évolution. Au niveau structural, la protéine MPV17 humaine est également composée de 176 acides aminés. Sa structure prédite possède 4 domaines transmembranaies et un site putatif de phosphorylation de protéine kinase C (Wong et al., 2007) (**Figure 2**).

Le phénotype principal de ces souris mutantes pour MPV17 est un syndrome néphrotique. Il se traduit par une inflammation des glomérules suivie d'une dysfonction sévère des reins vers l'âge de deux mois (O'Bryan et al., 2000). L'effet de cette mutation paraît donc tissu-spécifique malgré que le gène *MPV17* soit exprimé dans tous les tissus et durant tout le développement de la souris (Weiher et al., 1990). Suite à la découverte d'un homologue humain du gène *MPV17* (Karasawa et al., 1993), une étude sur la conservation fonctionnelle entre les deux homologues fut établie. Pour vérifier cette hypothèse, un vecteur exprimant le gène *MPV17* humain fut construit et introduit dans des souris *MPV17*<sup>-/-</sup>. Cette approche par sauvetage transgénique a montré que le gène humain MPV17 était capable de rétablir un phénotype glomérulaire normal (Schenkel et al., 1995). Cette expérience montre qu'il y a une conservation fonctionnelle de la protéine MPV17 entre la souris et l'humain. Elle indique également que la perte de fonction du gène *MPV17* est la cause du phénotype glomérulaire, ce qui n'était pas encore clairement établi avant cette découverte car l'insertion rétrovirale aurait pu affecter d'autres gènes situés à distance du site d'insertion.

Un second phénotype observé chez les souris *MPV17*<sup>-/-</sup> est une défaillance de l'oreille interne (Meyer zum Gottesberge et al., 1996). En effet, ces souris présentent une anomalie au niveau de l'oreille interne qui se reflète par un profond changement morphologique au niveau de l'organe de Corti et de la strie vasculaire tapissant le canal cochléaire (Meyer zum Gottesberge et al., 1996) inévitablement associée à une perte auditive complète chez les souris *MPV17*<sup>-/-</sup> âgées de sept mois (Müller et al., 1997). Ce double phénotype paraît au premier abord étonnant, mais est en réalité en corrélation avec de précédentes observations cliniques révélant une forte relation entre une défaillance du rein et une détérioration de l'oreille interne. Ces deux organes présentent un épithélium impliqué dans le transport actif d'ions et montrent une importante expression du collagène de type IV comme composant de la membrane basale de leur épithélium. Le phénotype glomérulaire et celui de l'oreille interne chez la souris *MPV17*<sup>-/-</sup> sont caractérisés par un épaississement de la membrane basale dans les deux organes. La protéine MPV17 ne faisant pas partie des composants structurels de la membrane basale, un rôle dans la régulation de l'abondance des protéines de la membrane basale fut proposé. Ainsi, une relation causale entre l'expression de MPV17 et la régulation de l'expression de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP2) fut observée. En effet, dans des cellules dérivées de souris *MPV17*<sup>-/-</sup>, MMP2 est surexprimé tandis qu'une surexpression constitutive du gène *MPV17* humain dans des fibroblastes de souris *MPV17*<sup>-/-</sup> diminue l'expression de MMP2 (Reuter et al., 1998). Cependant les mécanismes moléculaires permettant à MPV17 de réguler MMP2 sont mal connus.



Une seconde origine pouvant expliquer le phénotype glomérulaire serait une production augmentée de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS). En effet, une augmentation de la libération extracellulaire de ROS fut observée dans les glomérules rénaux des souris *MPV17<sup>-/-</sup>* (Binder et al., 1999) et a été associée à une diminution du potentiel de membrane des mitochondries et à une augmentation du stress oxydatif dans des cellules épithéliales des glomérules rénaux, les podocytes (Casalena et al., 2014). Or il a été démontré que les ROS sont capables de provoquer des dommages glomérulaires dans plusieurs modèles de maladies rénales (Johnson et al., 1994). En effet, les ROS peuvent directement perturber l'intégrité et la composition des protéines de la matrice de la membrane basale (Riedle and Kerjaschki, 1997). Cette relation causale est confirmée par la perte du phénotype glomérulaire chez des souris *MPV17<sup>-/-</sup>* traitées avec du diméthylthiourée, un antioxydant (Reuter et al., 1998).

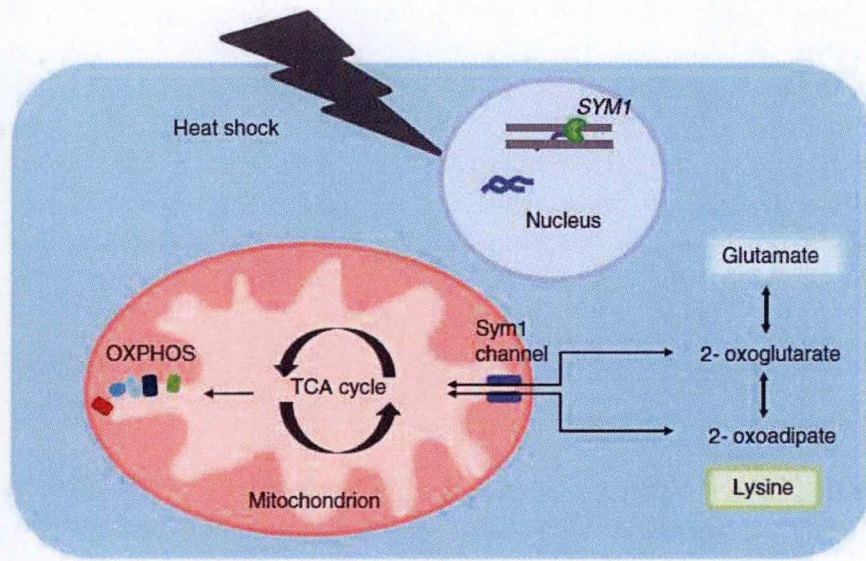
Malgré un phénotype hépatocérébral chez les patients mutés pour *MPV17*, les souris *MPV17<sup>-/-</sup>* ne montrent aucun signe de dommages au niveau du foie, malgré une diminution du contenu en ADNmt dans l'organe (Viscomi et al., 2009). Cela peut s'expliquer par un mécanisme de compensation mis en place dans le foie pour contrecarrer la réduction du nombre de copies d'ADNmt. En effet, il a été montré que le niveau des transcrits des gènes mitochondriaux n'est que modérément réduit chez les souris *MPV17<sup>-/-</sup>* comparées aux souris sauvages, malgré l'importante diminution en contenu de l'ADNmt allant de 70% dans les muscles à 95% dans le foie (Viscomi et al., 2009). Cela peut signifier que l'efficacité de la transcription est bien plus importante chez les souris *MPV17<sup>-/-</sup>* ou qu'il existerait une diminution de la dégradation des transcrits mitochondriaux dans le foie chez la souris *MPV17<sup>-/-</sup>*. Cependant, lorsque les souris subissent un régime cétonique important, elles manifestent des dommages au foie tels qu'une stéatose macrovasculaire et une hépatomégalie pouvant se développer en cirrhose et défaillance du foie au bout de deux mois de régime cétonique (Bottani et al., 2014). Une étude portant sur le développement de thérapie génique pour traiter les patients mutés pour *MPV17* a permis la construction d'un vecteur virus adéno-associé exprimant le gène *MPV17* humain. Ils ont ainsi pu observer que les souris *MPV17<sup>-/-</sup>* ayant reçu le gène *MPV17* humain ne montraient plus de dommages au foie après un régime cétonique (Bottani et al., 2014). Cela signifie que *MPV17* est nécessaire dans le foie de la souris lorsque celle-ci subit une activité métabolique hépatique intense provoquée par un régime cétonique.

## 2.2 L'homologue de la protéine MPV17 chez la levure : SYM1

Le gène *SYM1* (Stress-induced Yeast MPV17), fut identifié pour la première fois en 2004 par Trott et Morano chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, comme étant un gène, codant pour une protéine du même nom, impliquée dans la réponse au stress (Trott and Morano, 2004). Plus précisément, le gène *SYM1* est induit par un stress thermique lorsque la levure pousse sur un milieu contenant uniquement une source de carbone non fermentable telle que l'éthanol.

L'implication de SYM1 dans la réponse au stress thermique fut découverte suite à l'observation de l'incapacité des souches mutantes pour *SYM1*, *sym1Δ*, à pousser sur un milieu contenant de l'éthanol à 37°C, contrairement aux souches sauvages (Trott and Morano, 2004). Cette observation est intéressante, tout d'abord, parce que les souches mutantes *sym1Δ*, sont capables de croître sur un milieu contenant du glucose aussi bien à 30°C qu'à 37°C, tout comme les souches sauvages (Trott and Morano, 2004). Ensuite, parce que les souches mutantes *sym1Δ*





**Figure 3. SYM1, l'orthologue de la protéine MPV17 chez la levure.** La transcription du gène *SYM1* est activée suite à un choc thermique. Le rôle hypothétique de SYM1 est que celui-ci sert de canal permettant à des métabolites tels que  $\alpha$ -oxoglutarate et  $\alpha$ -oxoadipate d'être transportés du cytosol à la mitochondrie (Löllgen and Weiher, 2015).



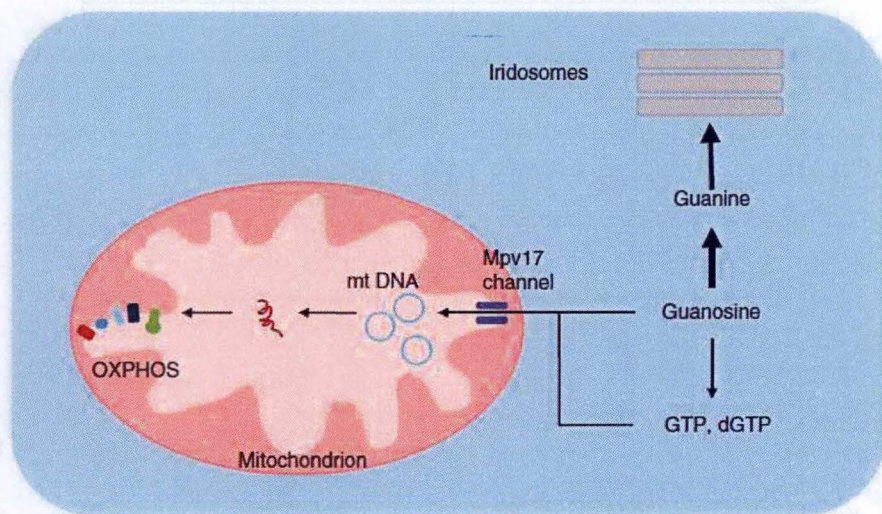
poussent aussi bien que la souche sauvage dans un milieu contenant de l'éthanol à 30°C (Trott and Morano, 2004). Sachant qu'une exposition à des conditions comprenant un choc thermique et la présence d'éthanol comme unique source de carbone sont des facteurs défavorables pour la croissance de la levure et sont considérés comme des facteurs de stress, on peut en déduire que le gène *SYM1* est induit en condition de stress important.

Une autre étude s'est intéressée à ce phénotype particulier des mutants *sym1Δ* et a cherché à comprendre pourquoi une combinaison de ces deux stress en particulier était nécessaire à l'induction du phénotype. L'étude a débuté par l'observation de formation de « petite » colonies, un terme désignant non seulement une plus petite taille des colonies, témoin d'une moindre prolifération, mais également des levures ayant une altération dans la chaîne respiratoire (Mounolou et al., 1966) qui peut être causée par une déplétion de l'ADNmt. Un autre phénotype des mutants *sym1Δ* est une importante détérioration de la morphologie des mitochondries au niveau des crêtes mitochondriales (Dallabona et al., 2010), venant confirmer une probable perte de l'intégrité des fonctions la mitochondrie et de son ADN. Sachant que l'éthanol nécessite une respiration cellulaire pour être métabolisé par la levure et qu'une intégrité de la structure des crêtes mitochondriales est indispensable pour une activité OXPHOS fonctionnelle, *SYM1* semble donc essentiel pour les OXPHOS bien que le mécanisme soit indéterminé.

Pour identifier le lien moléculaire entre *SYM1* et l'altération des OXPHOS, des supplémentations en différents acides aminés non essentiels ont montré que le glutamate, la glutamine, l'aspartate et l'asparagine sont capables de restaurer partiellement le phénotype OXPHOS des mutants *sym1Δ* (Dallabona et al., 2010). Ces quatre acides aminés non essentiels ont des dérivés communs qui sont l' $\alpha$ -cétooglutarate et l'oxaloacétate, tous deux des intermédiaires du cycle de Krebs, ce qui suggère l'implication de *SYM1* dans le contrôle de l'homéostasie des intermédiaires du cycle de Krebs. Cette hypothèse est supportée par la découverte de deux gènes, yeast mitochondrial carrier 1 (*YCM1*) et ornithine decarboxylase 1 (*ODC1*), dont la surexpression permet de rétablir le phénotype sauvage des mutants *sym1Δ* en terme de fonction OXPHOS et de stabilité de l'ADNmt (Dallabona et al., 2010). Le gène *YCM1* code pour une protéine mitochondriale impliquée dans la régulation du trafic de certains métabolites tels que l' $\alpha$ -cétooglutarate et le glutamate entre la mitochondrie et le peroxysome, ainsi qu'un probable rôle dans le transport d'autres intermédiaires du cycle de Krebs (Trotter et al., 2005). La surexpression du gène *OCD1*, quant à lui, permet une diminution d'approximativement 50% du nombre de « petite » colonies *sym1Δ*. La protéine codée par l'*OCD1* étant capable de transporter l' $\alpha$ -cétooglutarate et d'autres intermédiaires du cycle de Krebs ainsi que l' $\alpha$ -cétoadipate (Palmieri et al., 2001), une surexpression du gène peut augmenter le flux d'intermédiaires du cycle de Krebs vers la mitochondrie. Ces observations soutiennent l'hypothèse d'un rôle de *SYM1* dans le bon fonctionnement du cycle de Krebs grâce à sa capacité à approvisionner celui-ci en dérivés d'acides aminés. Pour compléter cette découverte, *SYM1* serait une protéine membranaire et semblerait agir comme un canal voltage-dépendant. Toutefois cette hypothèse est à prendre avec précaution car l'étude à l'origine de celle-ci se base sur un système artificiel de vésicules ne contenant que *SYM1* (Reinhold et al., 2012). Cela suggère que *SYM1* pourrait être un canal permettant aux intermédiaires du cycle de Krebs d'être transportés du cytosol à la mitochondrie (**Figure 3**).

Une analyse génétique a identifié le gène *MPV17* humain comme ayant la plus forte homologie de séquence avec le gène *SYM1*, avec 37% d'identité et 48% de similarité au niveau protéique.





**Figure 4. L'orthologue de la protéine MPV17 chez le poisson zèbre.** Rôle hypothétique de MPV17 chez le zebrafish comme canal permettant de fournir la mitochondrie en nucléotides, principalement la déoxyguanosine triphosphate (dGTP) synthétisée à partir de la guanosine. Celle-ci est également une source pour la synthèse de la guanine nécessaire à la composition des iridophores (Löllgen and Weiher, 2015).



Cette homologie de séquence et des techniques analytiques ont permis de prédire des caractéristiques structurales communes aux protéines codées par ces gènes. Ainsi, la protéine membranaire SYM1 présente quatre domaines transmembranaires qui ne sont pas sans rappeler la structure de la protéine MPV17 prédite, indiquant une importante conservation de l'architecture des domaines transmembranaires de cette protéine dans différentes espèces (Trott and Morano, 2004). De plus, la protéine SYM1 a été localisée dans la membrane interne de la mitochondrie (Trott and Morano, 2004) et identifiée comme faisant partie d'un complexe de 600 kDa (Dallabona et al., 2010) rappelant encore une fois les caractéristiques physiques de la protéine MPV17 chez les mammifères. Outre des similarités structurales prédites, SYM1 et MPV17 présentent également des similarités fonctionnelles. En effet, les mutants *sym1Δ* exprimant le gène *MPV17* humain, grâce à un plasmide, sont capables de croître sur un milieu contenant de l'éthanol à 37°C (Trott and Morano, 2004). Ces données sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles confirment que SYM1 est bien l'homologue de MPV17. Cependant un lien éventuel entre le rôle de SYM1 dans le contrôle du flux des intermédiaires du cycle de Krebs et la maintenance et l'intégrité de l'ADNmt chez les patients mutés pour *MPV17* reste à démontrer.

### 2.3 L'homologue de la protéine MPV17 chez le poisson zèbre

Il existe un mutant du poisson zèbre *Danio rerio* appelé le mutant *tra* dont le phénotype de transparence est dû à une perte de la pigmentation causée par une diminution du nombre des chromatophores mélanophores, responsables de la couleur foncée, et iridophores, responsables du reflet doré-argenté du poisson (Walker and Streisinger, 1983). Cette perte de pigmentation est causée par un problème d'épissage de l'ARNm codé par le gène *transparent*, ayant pour conséquence un décalage du cadre de lecture dû à une délétion (Krauss et al., 2013). La protéine codée par ce gène *transparent* se trouve être l'homologue de la protéine MPV17 humaine. En effet, la protéine MPV17 chez le *Danio rerio* possède 69% d'identité avec la protéine MPV17 humaine, ainsi que des domaines transmembranaires prédits et une localisation mitochondriale (Krauss et al., 2013) tout comme la protéine MPV17 humaine.

Pour expliquer la fonction que pourrait avoir la protéine MPV17 chez le *Danio rerio*, il faut savoir que les iridophores possèdent cette caractéristique réfléchissante grâce à une production et à une accumulation de cristaux, principalement composé de guanine, dans un organe appelé iridosome. Une mutation du gène *MPV17* provoque une diminution de l'iridosome ainsi qu'une réduction de l'activité OXPHOS. Cette dernière particularité pourrait être due à un approvisionnement réduit en guanine nécessaire à la réplication de l'ADNmt. En se basant sur cette hypothèse et sur la localisation mitochondriale de la protéine chez le *Danio rerio*, un rôle de canal permettant de fournir la mitochondrie en nucléotides fut proposé (**Figure 4**) (Löllgen and Weiher, 2015).

Cette hypothèse est cohérente avec l'existence d'autres mutants *Danio rerio* transparents causés par une mutation dans les gènes *PAICS* et *GART* qui codent tous deux pour des enzymes impliquées dans la synthèse de l'inosine monophosphate, un précurseur des nucléotides adénine et guanine (Krauss et al., 2013). De plus, une autre forme hépatique de SDAM chez l'homme est due à une mutation du gène *DGUOK* qui code pour la déoxyguanosine kinase. Cette protéine est impliquée dans le recyclage des déoxynucléotides pour la réplication de l'ADNmt (Mandel et al., 2001), c'est pourquoi un rôle similaire pour la protéine MPV17 humaine est envisageable chez l'homme.



## 2.4 La protéine MPV17 chez l'humain

Bien que la fonction moléculaire précise de MPV17 ne soit toujours pas claire, cette protéine participe probablement au maintien de l'ADNmt puisque des mutations dans le gène *MPV17* sont associées à la forme hépatocérébrale de SDAM (Spinazzola et al., 2006). Les caractéristiques cliniques associées aux SDAM dus à une mutation du gène *MPV17*, sont une hypoglycémie et une insuffisance hépatique à un stade précoce (Spinazzola et al., 2006; Uusimaa et al., 2014; Wong et al., 2007). Des symptômes neurologiques et des lésions cérébrales multiples peuvent apparaître à un stade tardif si les patients survivent à une insuffisance hépatique, celle-ci induisant la plupart du temps une mort prématurée (Blakely et al., 2012; Garone et al., 2012).

Chez l'homme, le gène est situé sur le chromosome 2p23-2 (Karasawa et al., 1993) et code pour une protéine de 176 acides aminés possédant 4 domaines transmembranaires ainsi qu'un site putatif de phosphorylation de protéine kinase C (**Figure 2**) (Wong et al., 2007). MPV17 est une petite protéine d'un poids moléculaire de 17 kDa mais faisant partie d'un complexe de haut poids moléculaire de ~ 600 kDa, de composition non identifiée (Bottani et al., 2014). La protéine a été initialement localisée au niveau du peroxyosome (Zwacka et al., 1994). Cependant, une étude ultérieure a utilisé des cellules COS7 (fibroblastes dérivées de tissus rénaux de singe) et HeLa (adénocarcinome utérin humain) transfectées avec une construction exprimant le gène *MPV17* humain pour montrer, par immunofluorescence et par immunoblot de fractions subcellulaires, que la protéine serait en réalité située au niveau de la mitochondrie et plus précisément au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Spinazzola et al., 2006).

La même étude a montré qu'une importante déplétion de l'ADNmt était observée dans le foie des souris *MPV17*<sup>-/-</sup> ainsi que dans le foie de patients ayant certaines mutations pour le gène *MPV17* (**Figure 2**). Cette déplétion est reflétée par une diminution de 90 à 95% du nombre de copies d'ADNmt dans les mitochondries du foie chez la souris *MPV17*<sup>-/-</sup>, comparées aux souris sauvages (Dalla Rosa et al., 2016; Spinazzola et al., 2006). Ainsi, l'idée d'un rôle de MPV17 dans le maintien de l'ADNmt est étayé par une étude sur des souris *MPV17*<sup>-/-</sup> où il a été démontré que l'introduction d'un vecteur exprimant le gène *MPV17* humain sauve le phénotype hépatique de ces souris en restaurant les niveaux d'ADNmt (Bottani et al., 2014). Un déficit de la respiration mitochondriale a été associé à la déplétion en ADNmt caractéristique des patients mutés pour *MPV17* (Spinazzola et al., 2006). Ce déficit fait écho à la diminution de l'abondance protéique de sous-unités de complexes I et IV de la chaîne de transporteurs d'électrons observée dans le foie des souris *MPV17*<sup>-/-</sup> (Dalla Rosa et al., 2016; Spinazzola et al., 2006) et à la réduction de l'activité des complexes III, IV et V observée chez la levure mutante pour *SYM1* (Dallabona et al., 2010). Chez cette dernière, la protéine SYM1 serait un canal permettant à des intermédiaires du cycle de Krebs d'être transportés du cytosol à la mitochondrie. Ce rôle expliquerait la capacité diminuée des mutants *sym1Δ* à stocker du glycogène étant donné que certains intermédiaires du cycle de Krebs interviennent également dans la gluconéogenèse. Ce rôle potentiel de MPV17 dans la gluconéogenèse expliquerait pourquoi les patients mutés pour *MPV17* présentent une hypoglycémie sévère ainsi qu'une diminution de glycogène au niveau du foie (Parini et al., 2009).

Le groupe de Spinazzola a récemment mis en lumière un rôle potentiel de la protéine MPV17 dans l'import de précurseurs de nucléotides cohérent avec les hypothèses émises sur le rôle de l'homologue MPV17 chez le *Danio rerio* (Krauss et al., 2013). Pour comprendre ce rôle

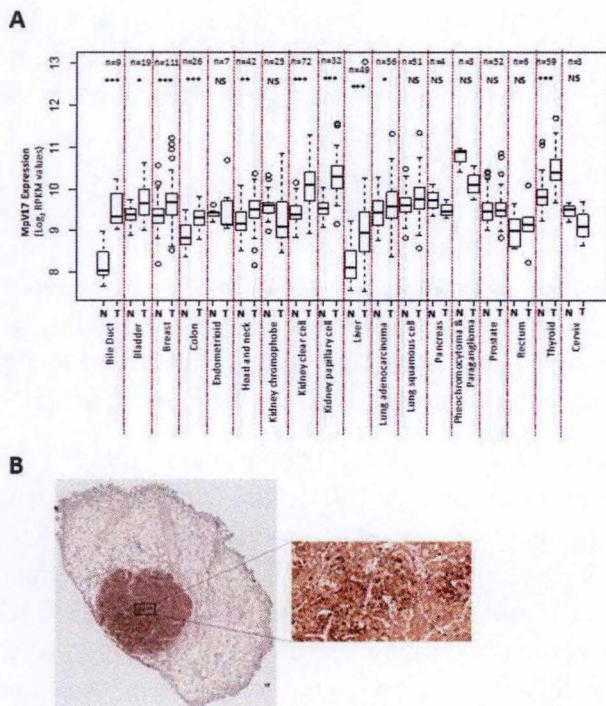


potentiel il faut savoir qu'une réplication de l'ADNmt correcte nécessite une réserve de dNTPs suffisante. Dans les cellules en prolifération, la réserve de dNTPs mitochondriale dépend de l'importation à partir du cytosol de dNTPs synthétisés *de novo* ou recyclés à partir de précurseurs de nucléotides (**Figure 1**). Dans les cellules quiescentes et postmitotiques, la réplication de l'ADNmt persiste, contrairement à la réplication de l'ADN nucléaire. Ainsi, la réserve de dNTPs des mitochondries est principalement maintenue par la voie mitochondriale de sauvetage des nucléotides en raison de l'inhibition de synthèse *de novo* de dNTPs dans les cellules non prolifératives. MPV17 jouerait un rôle dans cette voie de récupération mitochondriale, ce qui expliquerait pourquoi le niveau d'ADNmt dans cinq lignées de fibroblastes provenant de patients mutés pour *MPV17* est normal dans les cellules en division et diminué de 62% en moyenne dans les cellules non-prolifératives (Dalla Rosa et al., 2016).

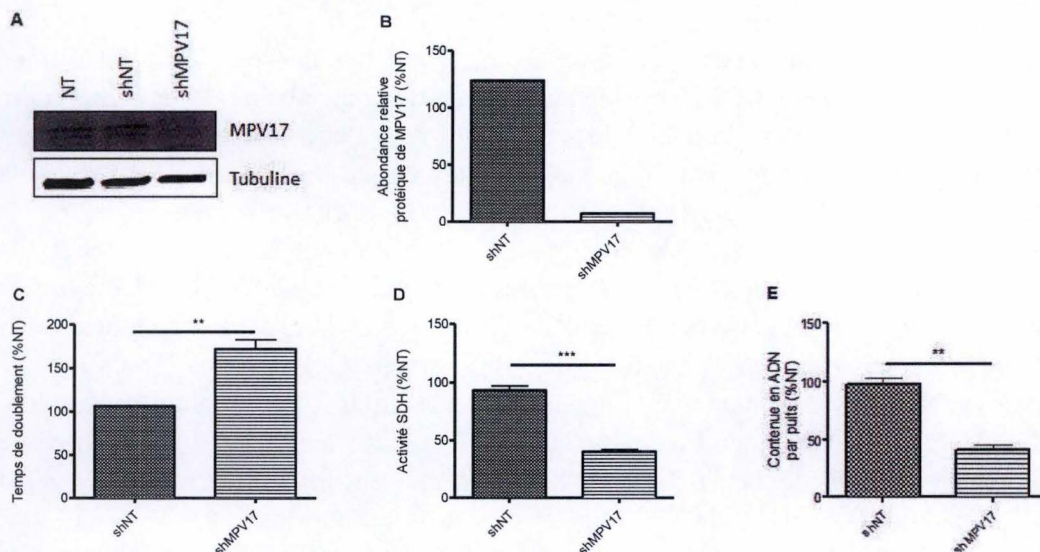
Une corrélation entre une déficience en déoxyguanosine triphosphate (dGTP) et déoxythymidine triphosphate (dTTP) dans les mitochondries du foie et un ralentissement de la réplication de l'ADNmt chez les souris *MPV17<sup>-/-</sup>*, ainsi que dans les fibroblastes humains mutés pour *MPV17* a été mise en évidence (Dalla Rosa et al., 2016). L'étude démontre également qu'une supplémentation en déoxynucléosides peut prévenir l'épuisement de l'ADNmt chez les fibroblastes quiescents mutés pour *MPV17* et permettre un maintien du niveau d'ADNmt. En effet, la supplémentation d'une combinaison de dNTPs contenant au moins de la déoxycytidine et déoxyguanosine est suffisante pour prévenir la déplétion de l'ADNmt dans des fibroblastes humains mutés pour *MPV17* (Dalla Rosa et al., 2016). Ces découvertes suggèrent que la cause de la diminution de l'ADNmt dans le déficit en *MPV17* serait une disponibilité limitée de la réserve de dNTPs. Cela montre également qu'une perte de fonction de *MPV17* liée aux SDAM serait causée par la désorganisation des réserves de déoxynucléotides. Ainsi, *MPV17* aurait un rôle dans l'importation de précurseurs de nucléotides dans la voie de sauvetage des nucléotides dans la mitochondrie.

Une étude plus récente, de la même équipe, est venue renforcer l'hypothèse qu'un point critique pour les maladies liées au gène *MPV17* est le métabolisme de la guanosine. Pour comprendre cette étude, il faut savoir que des ribonucléotides peuvent être malencontreusement incorporés à la place de déoxyribonucléotides dans le génome humain et que la mitochondrie possède la particularité d'être capable de mieux tolérer cette incorporation que le noyau (Reijns et al., 2012). L'étude a montré que dans le foie de souris *MPV17<sup>-/-</sup>*, la quantité totale de ribonucléotides monophosphates (rNMPs) incorporés était similaire à celle observée chez les souris sauvages. Cependant une analyse par emRiboSeq a montré que, dans le foie des souris *MPV17<sup>-/-</sup>*, on observait une augmentation de 40% supérieure de l'incorporation de ribonucléotides GMP (rGMPs), alors que le niveau des trois autres rNMPs n'était pas modifié (Moss et al., 2017). Étant donné que l'étude précédente (Dalla Rosa et al., 2016) avait montré une réduction en dGTP dans des souris *MPV17<sup>-/-</sup>*, ces observations peuvent être expliquées par une augmentation du ratio de rGTP/dGTP. Dans le cerveau et le cœur des souris *MPV17<sup>-/-</sup>*, une incorporation plus élevée d'approximativement 30% et 20%, respectivement, de rGMPs a été observée malgré un niveau normal de dGTPs et du nombre de copies d'ADNmt (Moss et al., 2017). Ces données suggèrent qu'une incorporation élevée de rGMPs dans l'ADNmt est une conséquence de la perte de la protéine *MPV17* dans tous les tissus, quelle que soit la quantité de nucléotides en réserve (Moss et al., 2017). Ainsi l'absence de *MPV17* court-circuiterait le bon approvisionnement en dGTPs nécessaire à une réplication fidèle de l'ADNmt menant à une mauvaise incorporation de rGMPs à la place des dGTPs puis à une délétion de l'ADNmt caractérisé chez les patients porteurs d'un gène *MPV17* muté. Ceci vient supporter l'idée que





**Figure 5. Analyse de l'expression de MPV17 dans des tissus cancéreux.** (A) Analyse de l'expression de MPV17 au niveau du transcrit dans différents tissus sains (N) comparés aux tissus cancéreux (T). Le référentiel TCGA (The Cancer Genome Atlas) a été utilisé pour analyser ces données générées par séquençage d'ARN (A. Wanet URBC, Données non publiées). (B) Analyse de l'abondance de MPV17 par immunohistochimie effectuée sur une biopsie hépatique d'un patient atteint d'hépatocarcinome. La zone marquée correspond à la zone tumorale (M. Najimi, Laboratoire de Pédiatrie Hépatologique, UCL, Données non publiées).



**Figure 6. Effet du silençage de MPV17 sur la prolifération cellulaire.** Les cellules Huh7 ont été transduites, ou non (NT), avec des vecteurs lentiviraux shRNA ne ciblant aucune séquence (shNT) ou ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17). (A) L'abondance de MPV17 a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la tubuline. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup> et cultivées pendant 4 jours. La prolifération a ensuite été évaluée (C) par comptage manuel pour calculer le temps de doublement, (D) par un test MTT et (E) le test Cyquant qui évalue la quantité d'ADN (C7026, ThermoFisher). Toutes les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 3). \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01 test t non apparié (M. Canonne, Données non publiées).



non seulement les pathologies liées à une mutation de *MPV17* sont bien dues à une altération de l'homéostasie des nucléotides mais également que *MPV17* aurait un rôle dans l'apport de dGTPs nécessaires à la réplication de l'ADNmt.

### 3. Résultats antérieurs obtenus au laboratoire

Dans notre laboratoire, nous étudions la protéine *MPV17* dans les cellules cancéreuses, un domaine de recherche encore inexploré. En utilisant le référentiel TCGA (The Cancer Genome Atlas) pour analyser des données générées par séquençage de l'ARN (RNA-Seq), une surexpression de *MPV17* au niveau du transcrit a été révélée dans plusieurs cancers, notamment au niveau du foie (**Figure 5A**). Ceci a été confirmé au niveau protéique par une immunohistochimie sur une biopsie hépatique d'un patient atteint d'adénocarcinome (**Figure 5B**).

Sur base de ces premières données, l'intérêt s'est porté sur l'implication de cette protéine dans le phénotype des cellules cancéreuses. Une répression de *MPV17* ralentit la prolifération cellulaire dans quatre différentes lignées cellulaires tumorales humaines que sont les Huh7 (**Figure 6A et B**), Hep3B, HepG2 (carcinomes hépatocellulaires) et les A549 (carcinome pulmonaire). Pour diminuer l'expression de *MPV17*, nous utilisons l'interférence par ARN. Ainsi, les cellules cancéreuses sont transduites avec des vecteurs lentiviraux contenant un gène codant pour un short hairpin RNA (shRNA) constitutivement exprimé ciblant l'ARN messager (ARNm) de *MPV17* (sh*MPV17*). Puis, les cellules transduites sont sélectionnées grâce à leur résistance à la puromycine. Dans ces conditions, la répression de *MPV17* provoque une diminution significative de 60% de la prolifération cellulaire dans les cellules Huh7 silencées pour *MPV17* par rapport aux cellules transduites avec un shRNA ne ciblant aucune séquence (shRNA non target, shNT) servant de condition contrôle (**Figure 6C, D et E**). Suite à cette découverte, les recherches se sont portées sur les mécanismes moléculaires par lesquels une réduction de l'expression de *MPV17* permet un ralentissement de la prolifération de cellules cancéreuses, que nous allons résumer ci-après.

#### 3.1 Analyse par RPPA d'acteurs associés au cycle cellulaire.

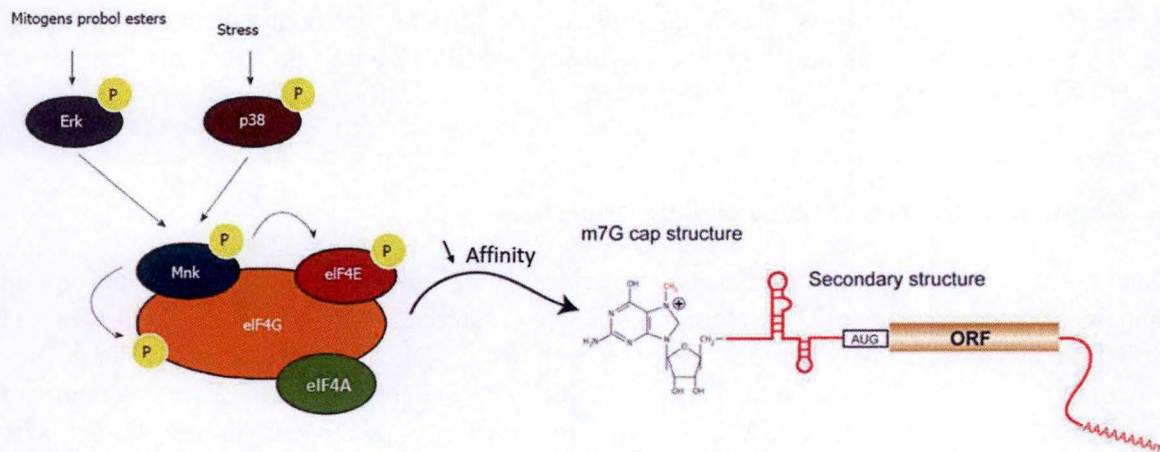
Dans un premier temps, une analyse reverse phase protein array (RPPA) fut réalisée sur des cellules Hep3B et A549 silencées pour *MPV17*. Cette technique permet d'évaluer l'abondance d'un nombre important de protéines simultanément et d'ainsi comparer le niveau d'expression de protéines étudiées dans plusieurs conditions expérimentales différentes (Spurrier et al., 2008). Cette technique a permis d'analyser l'expression de 297 protéines impliquées dans le cycle cellulaire<sup>1</sup>. Parmi ces protéines se trouve MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (MNK1), qui présente une expression diminuée dans les cellules silencées pour *MPV17* (M. Canonne, Données non montrées).

La protéine MNK1 est une sérine/thréonine kinase qui existe sous deux isoformes, MNK1A et MNK1B, toutes deux codées par le même gène *MNK1*. Les voies de Extracellular signal-regulated kinases (Erk) et de p38 Mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) activent MNK1

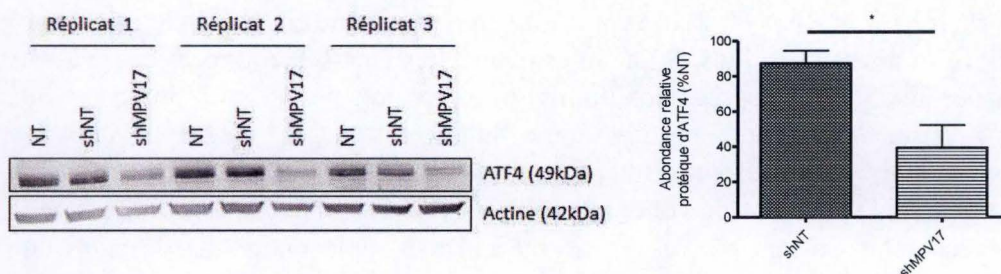
---

<sup>1</sup> <https://www.mdanderson.org/education-and-research/resources-for-professionals/scientificresources/core-facilities-and-services/functional-proteomics-rppa-core/index.html>





**Figure 7. Régulation et fonction de la protéine MNK1.** MNK1 est régulée par les protéines Erk et p38 qui elles-mêmes sont activées suite à l'action de mitogènes ou des facteurs de stress. Les protéines Erk et p38 activées phosphorylent MNK1 qui est recrutée au niveau de la protéine eIF4G où MNK1 phosphoryle la protéine eIF4E. Les protéines eIF4E et eIF4G font parties du complexe eIF4F avec la protéine eIF4A. Ce complexe initie le processus de traduction. Le rôle de la protéine eIF4E est de recruter l'ARNm qui doit être traduit au complexe eIF4F par la structure 5' m7G cap. Cependant, une phosphorylation d'eIF4E diminue son affinité avec la structure cap de l'ARNm (Joshi, 2014; Siddiqui and Sonenberg, 2015).



**Figure 8. Effet de la répression de MPV17 sur l'abondance d'ATF4 dans les cellules Huh7.** Les cellules ont été transduites, ou non (NT), avec des vecteurs lentiviraux shRNA ne ciblant aucune séquence (shNT) ou ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17). Les cellules ont été ensemencées à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup> et cultivées pendant 4 jours. Les protéines ont été extraites et l'abondance d'ATF4 a été évaluée par Western blot et quantifier par rapport à l'Actine en utilisant le logiciel ImageJ. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 3). \* p < 0,05; test t non apparié à deux queues (M. Canonne, Données non publiées).



par phosphorylation en réponse à un stress ou à une stimulation mitogénique (**Figure 7**) (Cargnello and Roux, 2011). La protéine MNK1 est principalement associée à la régulation du processus de traduction lorsqu'elle est activée, bien qu'elle puisse également exercer une fonction de régulation négative de l'activité de certains récepteurs tyrosine kinase et de régulation positive de la traduction de l'ARNm de TNF- $\alpha$  (Joshi, 2014). Dans le cadre de la régulation de la traduction, MNK1 phosphorylée peut se lier à eukaryotic initiation factor (eIF) 4G, qui fait partie, avec eIF4E, du complexe eIF4F responsable de l'initiation de la traduction (**Figure 7**). La protéine eIF4E recrute l'ARNm qui doit être traduit au complexe eIF4F par la structure 5' m7G cap. Une fois que MNK1 est recrutée au niveau du complexe eIF4F, il peut phosphoryler la protéine eIF4E, provoquant une diminution de l'affinité d'eIF4E pour la structure Cap de l'ARNm. Ainsi, eIF4E joue un rôle dans la synthèse des protéines y compris dans les cellules cancéreuses (Proud, 2015). Une surexpression de la protéine eIF4E a été détectée dans des cellules de lymphomes et de cancer du sein (Avdulov et al., 2004; Ruggero et al., 2004) et évaluée comme étant cruciale pour la tumorigenèse. En effet, eIF4E phosphorylé permettrait d'augmenter la traduction d'ARNm de proto-oncogènes tels que la matrix metalloproteinase-3 (MMP3) et le vascular endothelial growth factor C (VEGFC) (Furic et al., 2010). Ainsi, une diminution de l'activité de MNK1 peut amener à une réduction de la phosphorylation de eIF4E et à la diminution de la traduction d'ARNm codant pour des proto-oncogènes (Joshi, 2014).

### 3.2 Analyse par séquençage de l'ARN

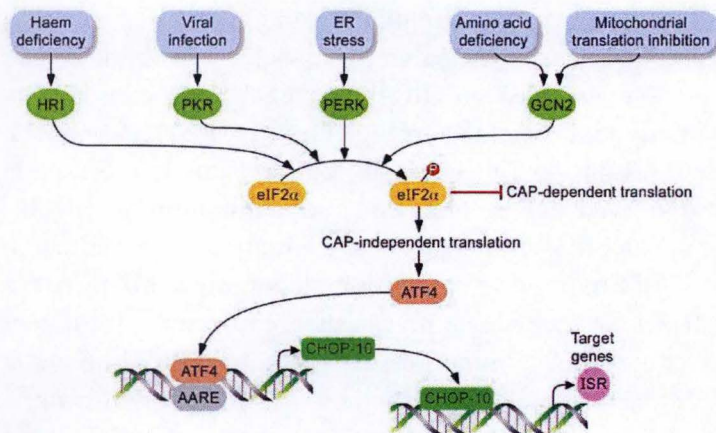
Une seconde approche par RNA-Seq fut effectuée pour analyser les gènes différemment exprimés entre des cellules cancéreuses silencées pour MPV17 et des cellules cancéreuses dont l'expression de MPV17 est inchangée. Le RNA-Seq a été réalisé sur des cellules Huh7 silencées pour MPV17 comparées à des cellules Huh7 transduites avec un shNT. Le RNA-Seq a permis de mettre en évidence la différence d'expression pour plus de 6 000 gènes.

#### 3.2.1 Diminution de l'expression d'ATF4

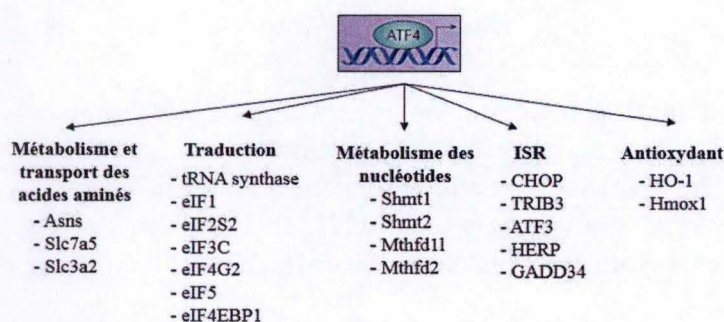
Parmi les gènes différentiellement exprimés et dont le pathway a été mis en évidence par le programme Ingenuity Pathway Analysis (IPA) se trouve Activating Transcription Factor 4 (ATF4). Celui-ci présente une expression diminuée dans les cellules silencées pour MPV17 au niveau du transcrit avec un  $\log_2$  fold change de -0,551 ( $p$ -value =  $1,02^{-6}$ ) selon le RNA-Seq. Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique avec une diminution systématique de 60 à 70% de l'abondance protéique d'ATF4 dans trois lignées cancéreuses différentes silencées pour MPV17, qui sont les cellules A549, Huh7 (**Figure 8**) et Hep3B. Ainsi, la diminution de l'expression d'ATF4 et de ses conséquences ont été investiguées pour tenter d'expliquer le phénotype prolifératif et de comprendre le lien putatif entre MPV17, ATF4 et le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses.

La protéine ATF4 est un facteur de transcription de type basic leucine zipper (bZIP) faisant partie de la famille des facteurs de transcription ATF/CREB (CREB, cyclic AMP response element binding protein) (Ameri and Harris, 2008). En plus de son domaine de liaison à l'ADN, ATF4 possède un domaine de dimérisation avec des membres de la famille AP-1 et C/EBP (Huggins et al., 2015) et un domaine régulateur.





**Figure 9. Activation d'ATF4 par des voies de stress intracellulaires.** Différents facteurs de stress tels qu'une déficience en hème, une infection virale, un stress du réticulum endoplasmique, une déficience en acides aminés ou une inhibition de la traduction mitochondriale peuvent provoquer la phosphorylation d'eIF2α par l'action de différentes protéines. Lorsqu'eIF2α est phosphorylé, celui-ci est capable d'inhiber le processus de traduction tout en augmentant l'expression d'ATF4. Celui-ci peut ensuite activer différents gènes tels que *CHOP-10* et permettre l'expression de gènes impliqués dans l'integrated stress response (ISR) (Arnould et al., 2015).



**Figure 10. Sélection de gènes régulés par ATF4.** ATF4 régule l'expression de gènes codant pour des protéines intervenant dans le métabolisme et le transport des acides aminés, dans le processus de traduction, dans le métabolisme des nucléotides, dans l'integrated stress response ou encore dans la détoxification contre les ROS. D'après Harding et al., 2003.



ATF4 est un régulateur clé dans la réponse cellulaire aux stress. De multiples voies de stress intracellulaires induisent une augmentation de la traduction d'ATF4 via un mécanisme dépendant de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Rutkowski and Kaufman, 2003). ATF4 est activé par des stress d'origine extrinsèque tels que la privation d'acides aminés, de glucose, l'accumulation de protéines dépliées dans la lumière du réticulum endoplasmique (stress ER), et l'excès de ROS (Ameri and Harris, 2008), regroupés dans la voie appelée integrated stress response (IRS) (**Figure 9**). ATF4 est connu pour réguler l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire (**Figure 10**). En effet, il coordonne l'expression de différents gènes tels que *CHOP-10* et *GADD34* (Harding et al., 2000; Novoa et al., 2001), afin de restaurer l'homéostasie cellulaire ou déclencher l'apoptose. Par le biais de ses nombreux gènes-cibles, ATF4 régule également l'homéostasie redox, le métabolisme des acides aminés et la synthèse de purines (Ben-Sahra et al., 2016; Harding et al., 2003).

Des fibroblastes d'embryons de souris ATF4<sup>-/-</sup> développent un phénotype de prolifération défectueuse. Cependant, une supplémentation en acides aminés non essentiels et en antioxydants, tel que le  $\beta$ -mercaptoéthanol, dans le milieu de culture permet de restaurer un phénotype prolifératif normal. Ces résultats sont cohérents avec le rôle d'ATF4 dans la maintenance de la réserve en acides aminés et dans la biosynthèse du glutathion (Harding et al., 2003). Il a également été observé qu'une inhibition de l'expression d'ATF4 permettait d'entraver la survie et la prolifération de cellules tumorales grâce à un déséquilibre de la balance redox et à une carence en acides aminés (Ye et al., 2010).

### 3.2.2 La voie de TGF- $\beta$

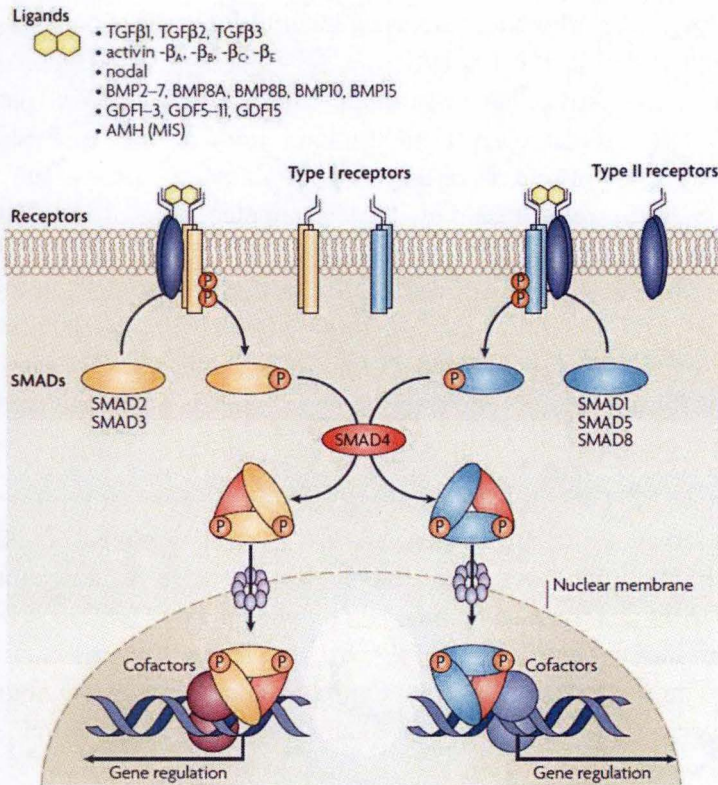
L'analyse des données de RNA-Seq a également pointé la voie de Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que nous allons décrire dans les paragraphes suivants.

TGF- $\beta$  est une cytokine faisant partie de la superfamille de ligands TGF- $\beta$  comprenant plus de 30 membres dont les isoformes de TGF- $\beta$ , les protéines bone morphogenic (BMP), les facteurs de croissance et de différenciation (growth differentiation factor, GDF), l'hormone anti-müllérienne (anti-müllerian hormone, AMH), la protéine Nodal, les protéines Activins et Inhibins (Massagué, 1998). Cette famille de cytokines est hautement conservée durant l'évolution et présente une extrême diversité de par leurs structures, leurs récepteurs, les signaux qu'ils transduisent et surtout par leurs fonctions.

#### 3.2.2.1 TGF- $\beta$ dans la physiologie humaine

Il existe trois isoformes de TGF- $\beta$  chez les mammifères. TGF- $\beta$ 1 fut la première isoforme identifiée suivi de TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, toutes trois codées par des gènes différents localisés sur des chromosomes différents (Massagué, 1998). TGF- $\beta$  est sécrété par une variété de cellules dont les fibroblastes et les cellules épithéliales, et toutes les cellules humaines expriment les récepteurs de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R). Ainsi, TGF- $\beta$  est capable de réguler l'expression de centaines de gènes, contrôlant des fonctions cellulaires très diverses impliquées dans des processus allant du développement lors de l'embryogenèse (morphogenèse, différenciation cellulaire, etc.) à l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (réplication cellulaire, régénération, cicatrisation, etc.) (Derynck and Miyazono, 2008).





**Figure 11. Voie de transduction du signal de TGF $\beta$ .** Les ligands de la famille de TGF $\beta$  se lient au dimère de récepteur de TGF $\beta$  de type II (T $\beta$ RII) qui recrute et active le dimère de récepteur de TGF $\beta$  de type I (T $\beta$ RI). Les T $\beta$ RI activés phosphorylent les protéines SMADs régulées par les récepteurs (R-SMADs). Les types de R-SMADs recrutés dépendent du ligand qui se lie aux récepteurs. Les R-SMADs activés forment un complexe SMADs avec le SMAD médiateur commun (co-SMAD). Le complexe SMADs est transloqué dans le noyau où il peut agir en tant que facteur de transcription et réguler l'expression de gènes cibles à l'aide de combinaison de co-facteurs (Tian and Schiemann, 2009).

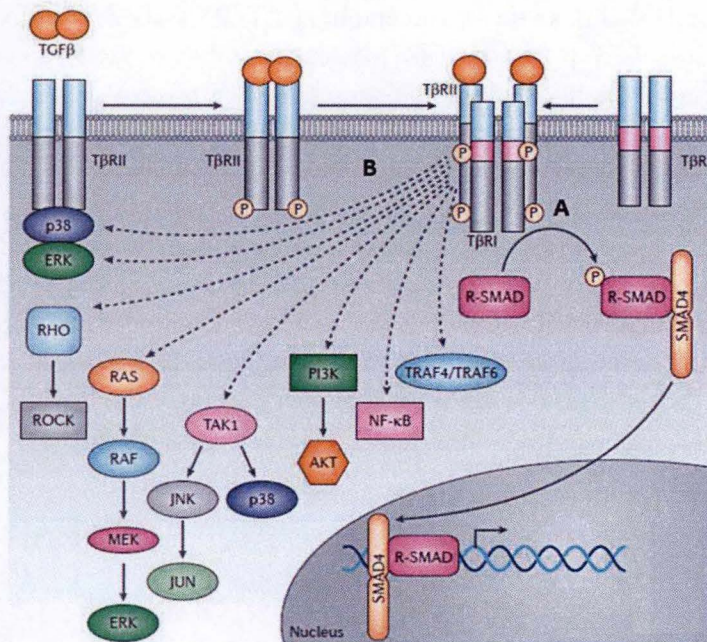


Le signal de TGF- $\beta$  commence lorsque le ligand se lie aux récepteurs de TGF- $\beta$ . Il existe deux types fonctionnels de T $\beta$ R, le récepteurs TGF- $\beta$  de type I (T $\beta$ RI) et de type II (T $\beta$ RII), tous deux possèdent un domaine kinase sérine/thréonine intracellulaire conservé (Shi and Massagué, 2003). Lorsque TGF- $\beta$  se lie à un dimère de T $\beta$ RII, constitutivement actif, celui-ci recrute un dimère de T $\beta$ RI qu'il active par phosphorylation (**Figure 11**). Le dimère de T $\beta$ RII et le dimère de T $\beta$ RI forment ensemble un hétérotétramère stable et activé (Yamashita et al., 1994). Une fois que le T $\beta$ RI est phosphorylé, celui-ci est capable d'activer une cascade de protéines appelées SMADs qui font partie de la voie canonique de transduction du signal de TGF- $\beta$ . Les protéines SMADs seront ensuite transloquées vers le noyau où elles agiront comme facteurs de transcription et pourront réguler positivement ou négativement l'expression d'un gène cible selon les co-facteurs intervenant dans la régulation de la transcription (Massagué et al., 2005).

Il existe huit protéines SMADs chez les mammifères, réparties en trois sous-groupes fonctionnels : les SMADs régulés par les récepteurs (R-SMADs), le SMAD médiateur commun (co-SMAD) et les SMADs inhibiteurs (I-SMADs) (Massagué, 1998). Les R-SMADs sont les SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8 et sont les substrats activables par les T $\beta$ Rs. Ces R-SMADs peuvent être divisés en deux branches : ceux en aval du signal de TGF- $\beta$ , Activin ou Nodal (SMAD2, SMAD3) et ceux activés en aval du signal de BMP ou GDF (SMAD1, SMAD5, SMAD8) (**Figure 11**). Cependant, TGF- $\beta$  est également capable de phosphoryler les SMAD1 et SMAD5 dans des cellules cancéreuses du sein (Liu et al., 2009). Il existe une protéine SMAD commune aux deux branches, SMAD4, qui forme un complexe avec un homodimère ou un hétérodimère de R-SMADs (**Figure 11**). La protéine adaptatrice SMAD anchor for receptor activation (SARA) est capable de recruter les R-SMADs aux récepteurs. Cette activation des R-SMADs leur permet de former un complexe avec SMAD4. Les SMADs inhibiteurs sont les SMAD6 et SMAD7. C'est ce dernier qui est capable de réguler négativement le signal induit par TGF- $\beta$  en provoquant la dégradation des T $\beta$ Rs par ubiquitination ou en entrant en compétition avec les R-SMADs au niveau de la liaison aux T $\beta$ Rs. La transcription des SMADs inhibiteurs est régulée par TGF- $\beta$  lui-même, ce qui signifie que ce mécanisme de régulation de la transduction du signal de TGF- $\beta$  se fait par feedback négatif. Cependant, il existe d'autres mécanismes et acteurs de régulation tels que des phosphatases permettant de déphosphoryler les R-SMADs, des protéines appelées SnoN et Man1, séquestrant les SMADs dans le cytoplasme ou la membrane nucléaire interne respectivement, ou encore des co-répresseurs perturbant l'activité transcriptionnelle des SMADs (Itoh and ten Dijke, 2007).

La régulation des gènes par les SMADs peut se faire par modification d'histones. En effet, le complexe SMADs est capable de recruter les histones acétyltransférases (HATs) p300 et CREB-Binding protein (CBP) permettant de stimuler la transcription d'un gène ou au contraire, recruter des histones déacétylases (HDAC) tels que HDAC1 entraînant une diminution de la transcription. Le choix du recrutement des HATs ou des HDACs se fait selon les partenaires interagissant avec le complexe SMADs (Ross et al., 2006). Le complexe SMADs est également capable de réguler des gènes par un mécanisme indépendant d'un remodelage de la chromatine. Dans le cas de l'activation de l'expression du gène *CDNK2B* codant pour la protéine p15<sup>INK4B</sup> inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines 4 (cyclin-dependent kinase, CDK), intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire, le complexe SMADs et forkhead box O3 (FoxO3), un second facteur de transcription, peut se lier au promoteur du gène *CDNK2B*. Une fois lié au promoteur, les facteurs de transcription recrutent un complexe de déméthylation, appelé DNA excision





**Figure 12. Voies de transduction du signal de TGFβ.** (A) Voie canonique de transduction du signal de TGFβ dépendante des protéines SMADs. (B) Voies non canoniques de transduction du signal de TGFβ indépendantes des protéines SMADs. Celles-ci comprennent les voies p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) et Jun N-terminal kinase (JNK), Rho-like GTPases (RHO), RAS et extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et AKT, NF-κB et TRAF4/6 (Akhurst and Hata, 2012).



repair, permettant de démétyler le promoteur et d'activer l'expression du gène *CDNK2B* (Thillainadesan et al., 2012).

La voie des SMADs est la voie canonique de transduction du signal de TGF- $\beta$  (**Figure 12A**) mais il existe également des voies non canoniques ou dites indépendantes de l'activité des SMADs (SMAD-indépendent) (**Figure 12B**). Ainsi, le signal de TGF- $\beta$  peut être transmis par d'autres facteurs que SMADs et amener à l'activation d'autres voies de signalisation telles que p38 MAPK et Jun N-terminal kinase (JNK), Rho-like GTPases, ERK, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et AKT (Tian and Schiemann, 2009). Bien que la plupart de ces voies soient impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) suite à une activation par TGF- $\beta$ , certaines voies telles que la voie JNK/p38 interviennent dans l'apoptose (Zhang, 2009).

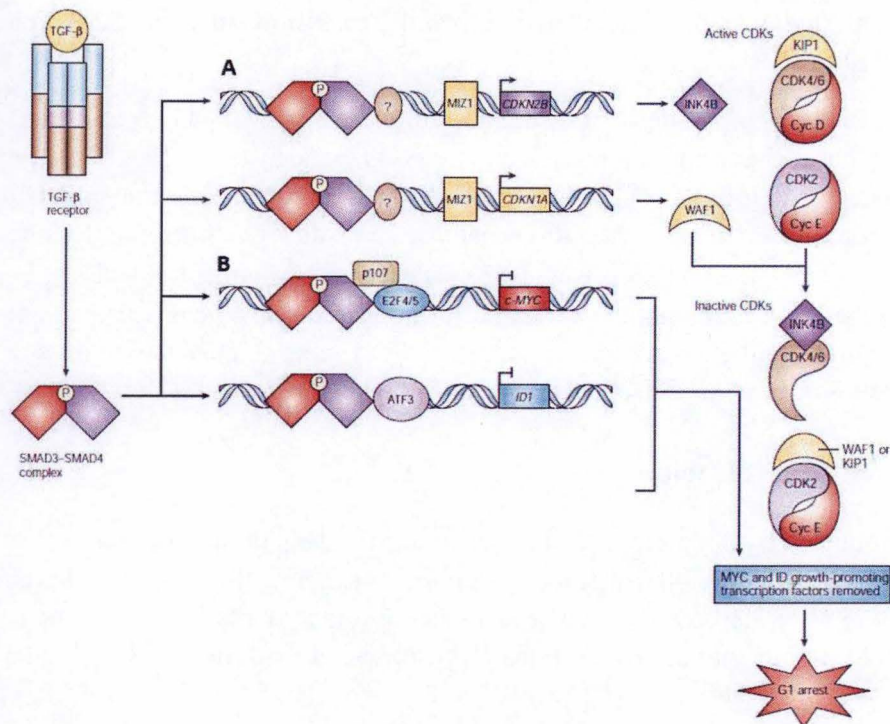
### 3.2.2.2 TGF- $\beta$ dans le foie

TGF- $\beta$  est capable de moduler de nombreuses et diverses fonctions dans un nombre tout aussi varié de types cellulaires dont les hépatocytes. Comme plusieurs lignées cellulaires d'hépatocarcinome ont été choisies comme modèle dans cette étude, et plus précisément la lignée cellulaire hépatocarcinome appelée Huh7, nous rappelons les fonctions de TGF- $\beta$  dans un foie sain.

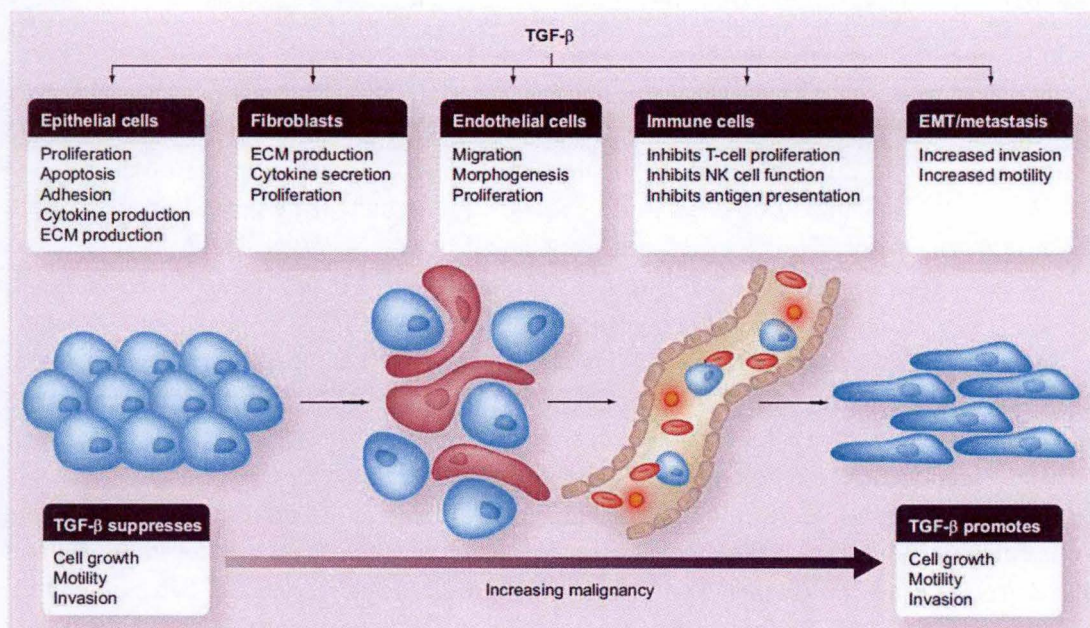
TGF- $\beta$  est connu pour être impliqué dans le processus de développement embryonnaire tout comme dans l'homéostasie tissulaire dans différents organes, et le foie ne fait pas exception. En effet, TGF- $\beta$  a été démontré comme étant impliqué dans le développement du foie durant l'embryogenèse grâce à sa capacité à induire le développement des hépatoblastes, précurseurs des hépatocytes et des cellules épithéliales du canal biliaire, à partir de l'endoderme (Pelton et al., 1991). TGF- $\beta$  intervient également dans la maintenance de l'identité des hépatoblastes (Zaret, 2008).

Chez l'adulte, une des capacités les plus étonnantes du foie est celui de pouvoir se régénérer après une hépatectomie partielle, allant jusqu'à 70%. En effet, 95% des hépatocytes quiescents sont capables de sortir de la phase G0 du cycle cellulaire et de proliférer pour permettre une récupération de la masse du foie initiale, et ce tout en maintenant la fonctionnalité de celui-ci (Michalopoulos, 1997). Tandis que des cytokines telles que le facteur de croissance hépatique (hepatocyte growth factor, HGF) et TGF- $\alpha$  sont capables de stimuler la croissance et la prolifération des hépatocytes, TGF- $\beta$  a un effet antiprolifératif, en provoquant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire, sur les cellules du foie (Kanamaru et al., 2003). Ainsi, lors du stade précoce de la régénération pendant lequel les hépatocytes doivent proliférer, ceux-ci sont capables de contourner l'effet antiprolifératif de TGF- $\beta$  en diminuant l'activité des T $\beta$ Rs ou en favorisant l'expression de répresseurs de la transcription de gènes ciblés par TGF- $\beta$  (Thenappan et al., 2010). Cependant, la fonction antiproliférative de TGF- $\beta$  intervient tout de même dans la régulation de la régénération du foie. En effet, TGF- $\beta$  permet de mettre un terme à la croissance du foie une fois que l'organe est régénéré. De plus, lorsque le foie est trop endommagé suite à un trouble chronique qui ne permet plus la prolifération des hépatocytes, TGF- $\beta$  possède un second rôle important dans le foie, celui d'activer les cellules progénitrices du foie adulte (Karkampouna et al., 2012). Celles-ci deviennent alors une source de réapprovisionnement cellulaire et contribuent à la réparation tissulaire et la régénération du foie. Ainsi, TGF- $\beta$  contribue à la différenciation cellulaire dans le foie non seulement chez l'embryon mais également chez l'adulte.





**Figure 13. Fonction anti-proliférative de TGFβ par arrêt du cycle cellulaire.** (A) TGF-β peut induire l'expression des gènes *CDKN2B* et *CDKN1A* codant pour p15<sup>INK4B</sup> et p21<sup>CIP1</sup> respectivement. Ces protéines sont des inhibiteurs de CDKs. p15<sup>INK4B</sup> et p21<sup>CIP1</sup> inhibent CDK4/6 et CDK2 respectivement. Leur activation engendre un arrêt progressif du cycle cellulaire en phase G1. (B) TGF-β peut réduire le niveau de transcrit des gènes *MYC* et *ID* dont les rôles sont, entre autre, de favoriser la croissance et la division cellulaire (Siegel and Massagué, 2003).



**Figure 14. Transition de la fonction anti-tumorale de TGFβ en fonction pro-tumorale.** Les cellules cancéreuses sont capables de développer des stratégies leur permettant d'échapper aux fonctions anti-tumorales de TGFβ. Elles sont capables d'utiliser le signal de TGFβ pour agir sur les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires et détourner les fonctions de ce signal à leur avantage ainsi que de provoquer une transition épithélio-mésenchymateuse (Tian and Schiemann, 2009).



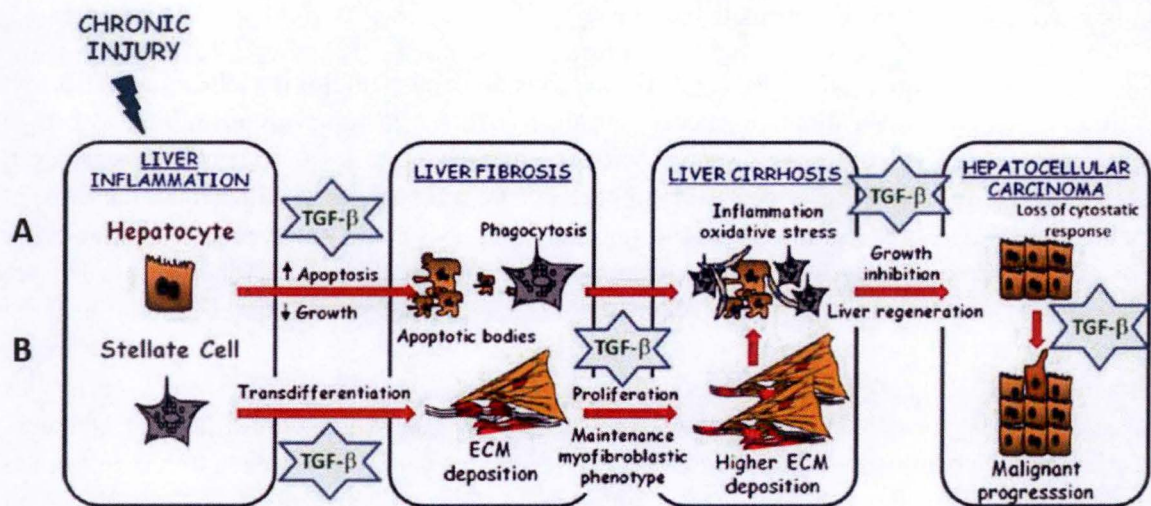
### 3.2.2.3 TGF- $\beta$ dans le cancer

TGF- $\beta$  est une cytokine pléiotropique impliquée dans diverses pathologies telles que la fibrose, les troubles de la cicatrisation ou encore le cancer. Durant la tumorigenèse, TGF- $\beta$  est un suppresseur de tumeur durant les stades précoces mais lorsque les cellules cancéreuses ont acquis la capacité de résister à cet effet suppresseur de tumeur, les cellules cancéreuses sont capables de transformer la fonction anti-tumorale de TGF- $\beta$  en pro-tumorale (Fabregat et al., 2016). Ce paradoxe, bien qu'étonnant, n'est pas le seul qui existe dans les fonctions de TGF- $\beta$ . En effet, TGF- $\beta$  peut avoir un effet antiprolifératif et contrôler la croissance cellulaire, il est capable d'intervenir dans le maintien de la pluripotence des cellules souches et permettre leur différenciation, il peut empêcher les cellules pré-malignes de proliférer et favoriser les métastases. Ces fonctions paradoxales sont possibles grâce aux multitudes de facteurs intervenant dans la transduction du signal de TGF- $\beta$  et dans la régulation de la transcription des gènes-cibles de TGF- $\beta$ . Elles dépendent également du statut épigénétique de la cellule rendant les fonctions de TGF- $\beta$  contexte-dépendante (Massague, 2012).

Dans un premier temps, TGF- $\beta$  agit comme suppresseur de tumeur grâce aux effets cyostatiques dont il est capable c'est-à-dire l'inhibition de la prolifération et l'apoptose. L'inhibition de la prolifération peut se faire par la régulation de l'expression de différents gènes par TGF- $\beta$ . Ainsi, TGF- $\beta$  peut induire l'expression des gènes *CDKN1A* et *CDKN2B* codant pour p21<sup>CIP1</sup> et p15<sup>INK4B</sup> respectivement (Feng et al., 2000; Yoo et al., 1999). Ces protéines sont des inhibiteurs de CDK (cyclin kinase inhibitors, CKI) et leur activation engendre un arrêt progressif du cycle cellulaire en phase G1 (**Figure 13A**). TGF- $\beta$  est également capable de réduire le niveau de transcrit des gènes *MYC* et *ID* dont les rôles sont, entre autres, de favoriser la croissance et la division cellulaire (**Figure 13B**) (Siegel and Massagué, 2003). Bien que les mécanismes par lesquels TGF- $\beta$  induit l'apoptose *in vivo* soient moins bien connus, des études ont suggéré que TGF- $\beta$  était capable d'induire la death-associated protein kinase (DAPK), le récepteur de mort FAS, la protéine pro-apoptotique BH3-only BIM et GADD45 $\beta$  (Pardali and Moustakas, 2007). TGF- $\beta$  peut également agir en tant que suppresseur de tumeur de façon indirecte en régulant négativement la sécrétion de facteurs mitogènes sécrétés par les fibroblastes. Une autre fonction de TGF- $\beta$  limitant la transition des cellules pré-malignes en des cellules malignes est son action immunosuppressive. En effet, TGF- $\beta$  est capable de réguler la croissance et le fonctionnement de cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes T et les Natural Killer afin de favoriser la tolérance immunitaire et réduire les réactions inflammatoires excessives. Cette fonction est indispensable dans des cas où une rupture de la tolérance peut amener à des risques de provoquer un cancer, comme c'est le cas au niveau de la muqueuse intestinale (Massagué, 2008).

Cependant, les cellules cancéreuses sont connues pour développer des stratégies leur permettant d'échapper à ce type de fonctions (**Figure 14**). Elles peuvent, dans le cas présent, perturber le signal de TGF- $\beta$  ou dévier les fonctions de celui-ci à leur avantage. Ainsi, une perte de réponse des gènes cyostatiques peut être observée dans certains cancers associés à une perturbation dans l'induction de p15<sup>INK4B</sup> et de la répression de *MYC* (Massagué, 2008). Les cellules cancéreuses peuvent prendre avantage des fonctions immunosuppressives de TGF- $\beta$  pour échapper à la surveillance immunitaire. Une production de TGF- $\beta$  a également été associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Heldin et al., 2012). La TEM est un processus physiologique nécessaire durant le développement embryonnaire mais il peut également être associé au développement de fibroses et de métastases. Ainsi, TGF- $\beta$  peut réguler négativement





**Figure 15. Les différentes actions de TGF $\beta$  dans le foie suite à une blessure chronique.** (A) La fonction anti-tumorale de TGF $\beta$  est observée à partir des premiers signes d'inflammation hépatique jusqu'à l'étape précédant la formation du carcinome hépatocellulaire, la cirrhose du foie. À partir de la formation de l'hépatocarcinome cellulaire, une perte des fonctions anti-tumorales est observée à un stade tardif et laisse place à une fonction pro-tumorale de TGF $\beta$ . (B) Les cellules stellaires du foie produisent l'essentiel de la matrice extracellulaire qui est propice à la formation de fibrose puis de cirrhose hépatique lorsqu'elle est en excès (Fabregat et al., 2016).



les gènes codant pour la E-Cadhérine, un composant des jonctions épithéliales, et favoriser la transition des cellules épithéliales en phénotype mésenchymateux qui contribue à la progression du cancer grâce à aux propriétés d'adhésion et d'invasion que les cellules mésenchymateuses-like possèdent (Akhurst and Hata, 2012). Ce sont essentiellement les voies non canoniques de TGF- $\beta$  qui sont empruntées pour induire cette transition, notamment, les voies Ras/MAPK, mTOR, Wnt/ $\beta$ -Caténine, Jagged/Notch et Rho/ROCK (Tian and Schiemann, 2009). Ces voies peuvent être empruntées seules ou en association avec la voie dépendante des SMADs. Finalement, TGF- $\beta$  peut stimuler la formation de myofibroblastes à partir de précurseurs mésenchymateux. Ces cellules sont propices à la progression tumorale car elles sécrètent des métalloprotéases intervenant dans la dégradation de la lame basale et des cytokines telles que VEGF impliqué dans la néoangiogenèse, des étapes clés dans le développement de métastases (Massagué, 2008).

#### 3.2.2.4 TGF- $\beta$ dans le cancer du foie

Au vu des nombreuses et complexes fonctions de TGF- $\beta$  dans l'homéostasie tissulaire et la régulation dans la progression d'un cancer comme expliqué dans les points précédents, il n'est pas étonnant que celui-ci soit également impliqué dans les maladies liées au foie telles que la fibrose hépatique et les carcinomes hépatocellulaires (CHC). TGF- $\beta$  peut agir comme cytokine profibrogénique grâce à sa capacité d'activer les cellules stellaires du foie (**Figure 15B**). Celles-ci sont des cellules connues pour produire l'essentiel de la matrice extracellulaire qui, en excès, est propice à la formation de fibrose hépatique (Fabregat et al., 2016). De plus, la formation de fibrose dans le foie est susceptible d'évoluer en cirrhose du foie si la source externe de la fibrose, la plupart du temps une blessure chronique provoquant des réactions inflammatoires importantes, persiste.

Durant l'hépatocarcinogenèse, la fonction suppresseur de tumeur de TGF- $\beta$  est observée à partir des premiers signes d'inflammation hépatique jusqu'à l'étape précédent la formation du carcinome hépatocellulaire, c'est-à-dire la cirrhose du foie (**Figure 15A**). Dans les cellules normales et prémaligènes, TGF- $\beta$  est un régulateur de l'homéostasie tissulaire et un suppresseur de la progression tumorale. Cette fonction est possible grâce aux effets cytotostatiques dont il est capable, telles qu'une diminution de la croissance cellulaire et une augmentation de l'apoptose. Cependant, dans les étapes ultérieures de la tumorigenèse, TGF- $\beta$  peut perdre sa fonction de anti-tumorale sur les cellules hépatocytaires prémaligènes et devenir un promoteur tumoral en favorisant la migration des cellules tumorales, la TEM, l'invasion et la dissémination métastatique (Yamazaki et al., 2011).

Ainsi, les cellules du carcinome hépatocellulaire peuvent devenir résistantes aux effets cytotoxiques du TGF- $\beta$ , ce qui entraîne ce changement de fonction anti-tumorale en pro-tumorale de TGF- $\beta$  (Ji et al., 2006). Les cellules du CHC acquièrent la capacité d'activer des signaux prolifératifs et anti-apoptotiques via des voies promotrices telles que celles du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor, EGF) et du facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor, PDGF). Elles seront également capables de provoquer la TEM par répression de gènes codant pour des protéines de jonctions cellulaires épithéliales telles que la E-Cadhérine amenant à la perte de caractéristique épithéliale tout en acquérant des propriétés du mésenchyme mais également de réorganisation du cytosquelette (Fabregat et al., 2016).



### 4. Objectifs du mémoire

Dans notre laboratoire, il a été montré qu'une répression de MPV17 ralentissait la prolifération cellulaire dans quatre différentes lignées cellulaires de cancer humain qui sont les Huh7, Hep3B, HepG2 (carcinomes hépatocellulaires) et les A549 (carcinome pulmonaire). Basé sur cette observation, ce mémoire se divise en deux axes. Le premier vise à investiguer des mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer le phénotype de faible prolifération des cellules silencées pour MPV17. Le second axe vise à développer une lignée cellulaire dont la répression pour MPV17 est inductible et non plus constitutive comme utilisé précédemment, pour des raisons expliqués plus bas

Le premier objectif est donc d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels la diminution de l'abondance de la protéine MPV17 ralentit la prolifération des cellules cancéreuses. Dans ce but, nous avons exploité les données de RNA-Seq récemment obtenues dans notre laboratoire à partir des cellules Huh7 silencées pour MPV17 ou non (shNT). Le logiciel Ingenuity® Pathway Analysis (IPA), un puissant outil d'analyse et de recherche pour interpréter l'ensemble de données à haut débit, indique plus de 6 000 gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions ( $p < 0,01$ ). IPA englobe une large base de données et un algorithme puissant pour identifier les relations, les mécanismes, et fonctions impliquant l'ensemble des données pour prédire les potentiels régulateurs et réseaux en amont des gènes différentiellement exprimés. Sur base de l'analyse IPA des régulateurs en amont (upstream regulators), nous nous sommes intéressés à deux molécules et leurs voies associées qui pourraient contribuer au phénotype de faible prolifération dans les cellules silencées pour MPV17 : (I) le rôle du TGF- $\beta$ 1 et (II) le rôle d'ATF4 dans l'homéostasie oxydative et donc indirectement la prolifération cellulaire.

Nous souhaitons construire une lignée cellulaire dont la répression de MPV17 est inductible car lors de l'utilisation de la lignée cellulaire ayant une répression de MPV17 constitutive, nous avons remarqué que le phénotype de faible prolifération des cellules silencées pour MPV17 s'atténuait progressivement au cours des passages, suggérant une adaptation de ces cellules à la répression de MPV17. Nous allons dans un premier temps objectiver cette observation, et dans un second temps construire une lignée cellulaire Huh7 dont la répression de MPV17 sera inductible, afin d'empêcher les interprétations erronées dues à l'adaptation des cellules à la répression constitutive de MPV17.



## II. MATERIEL ET METHODES



## 1. Culture cellulaire

**Table 1. Culture cellulaire**

<b>Matériel</b>	<b>Firmes</b>	<b>Références</b>
Cellules Huh7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
Cellules HEK293T	ATCC	CRL-3216
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1g/L glucose	Life technologies	#31885-023
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5g/L glucose	Life technologies	#41965-062
Sérum de veau fœtal	Life technologies	#10270-106
Glutamine	Sigma-Aldrich	#G8540
Tampon Phosphate Salin (PBS) - NaCl 150mM - Tampon de phosphate 10mM pH7.4 - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O	- Merck  - Merck - Merck	- 7647145  - 3276 - 430639
Trypsine-EDTA - Trypsine - EDTA	- Life technologies - Merck	- #25300-054 - 08418
Flasque de culture - 75cm <sup>2</sup> (T75) - 25cm <sup>2</sup> (T25)	- Corning - Corning	- 3276 - 430639
Centrifugeuse	Eppendorf	5702



## II. Matériel et Méthodes

### 1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire Huh7 (carcinome hépatocellulaire) est maintenue dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1g/L de glucose (DMEM Low Glucose) 10% de sérum de veau fœtal (SVF), et la lignée cellulaire HEK293T (human hamster kidney epithelial cell line) est maintenue dans du DMEM 4,5g/L de glucose (DMEM High Glucose) contenant 10% de SVF et 2mM de glutamine. Les lignées cellulaires sont régulièrement passées deux à trois fois par semaine. Pour ce faire, le milieu est décanté des boîtes de culture ayant une surface de 75cm<sup>2</sup> (T75) ou de 25cm<sup>2</sup> (T25), puis les cellules sont rincées avec du tampon phosphate salin (phosphate buffer saline, PBS) afin d'éliminer les inhibiteurs de trypsine contenus dans le sérum. Une fois le PBS retiré, de la trypsine EDTA est ajoutée (1ml/T75 ou 0,3ml/T25) afin de détacher les cellules adhérentes aux boîtes de culture grâce à la capacité de la trypsine, une peptidase, à cliver les protéines membranaires d'adhésion. Les cellules détachées sont mises en suspension avec du milieu. Le tout est récupéré dans un tube et centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes afin de former un culot de cellules. Après centrifugation, le surnageant est décanté et le culot cellulaire est gardé. Ce culot est resuspendu avec du milieu et distribué dans de nouvelles boîtes contenant un volume final de 15ml/T75 et 5ml/T25 de culture cellulaire dans leur milieu. Les deux lignées cellulaires sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> (Matériel Table 1).

### 2. Transduction lentivirale

#### *Principe*

Une transduction lentivirale consiste en l'introduction d'ADN exogène dans une cellule eucaryote utilisant un virus comme vecteur, dans ce cas-ci un lentivirus. Par ce procédé, il est possible d'introduire un virus porteur du transgène, produit par des cellules d'emballage, dans des cellules eucaryotes. La cellule hôte sera capable d'intégrer cette séquence exogène à son propre ADN endogène. Dans le cadre de ce mémoire, les plasmides utilisés possèdent une séquence de shRNA (short hairpin RNA) ciblant l'ARNm de la protéine MVP17 et ont ainsi pour but de réprimer l'expression de la protéine par RNA interférence, c'est-à-dire par dégradation de l'ARN messager (ARNm) cible qui aura pour conséquence la réduction de l'abondance de la protéine cible.

#### *Méthodes*

##### 2.1 Amplification du plasmide

Le plasmide pLKO-IPTG-3xLacO (12ng/μl) est amplifié par transformation bactérienne. Pour ce faire, le plasmide est incubé avec la bactérie compétente *Escherichia Coli* Stbl3 dans un tube et chauffé à 42°C permettant aux bactéries d'intégrer le plasmide. Le milieu liquide Luria Bertani (LB) préchauffé est ajouté au tube contenant les bactéries et le plasmide. Puis le tout est incubé pendant 1 heure avec une agitation de 225tr/min. Le contenu du tube est ensuite étalé sur une boîte de Petri contenant du milieu solide LB, composé de LB Medium et d'Agar 1,5%, et incubé pendant 24 heures dans une étuve à 37°C. Le lendemain, 2 à 3 colonies de bactéries par boîte de Petri sont prélevées et déposées dans un tube contenant 2 ml de milieu LB et d'ampicilline et incubées à 37°C pendant 6h sous agitation. Le contenu du tube est ensuite



## 2. Transduction lentivirale

**Table 2.1. Amplification du plasmide**

Matériel	Firmes	Références
Plasmide pLKO-IPTG-3xLacO	Sigma-Aldrich	#09301606MN
Bactérie Escherichia Coli Stbl3	Invitrogen	C7373-03
Milieu liquide LB - LB Medium	- Lennox-Roth	- X964.2
Milieu solide LB - LB Medium - Agar 1,5%	- Lennox-Roth - BD Bacto	- X964.2 - #214010
Boîte de Petri	Greiner Bio One	633179
Ampicilline	Roche	N°10835242001

**Table 2.2. Extraction et purification des plasmides amplifiés**

Matériel	Firmes	Références
Plasmid Plus Maxi Kit - Buffer P1 - Buffer P2 - Buffer S3 - Buffer BB - Buffer ETR - Buffer PE	QIAGEN	N°12963
Nanodrop	Isogen Life Science	#9742

**Table 2.3. Production de lentivirus**

Matériel	Firmes	Références
Cellules HEK293T	ATCC	CRL-3216
Flasque de culture T75	Corning	3276
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5g/L glucose	Life technologies	#41965-062
Sérum de veau fœtal	Life technologies	#10270-106
Glutamine	Sigma-Aldrich	#G8540
Plasmide pLKO-IPTG-3xLacO	Sigma-Aldrich	#09301606MN
Milieu Opti-MEM 5%	Invitrogen	#31985-047
Lipofectamine 2000	Invitrogen	#11669-019
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1g/L glucose	Life technologies	#31885-023
Filtre 0,45µm	Sarstedt	831826



transvasé dans un erlenmeyer d'un volume plus important contenant 200ml de milieu LB et 200µl d'ampicilline et incubé à 37°C sous agitation pour la nuit. Les bactéries contenant les plasmides sont sélectionnées grâce à leur résistance à l'ampicilline acquise grâce à la présence du plasmide. Le lendemain, les plasmides peuvent être extraits et purifiés (Matériel Table 2.1.).

### 2.2 Extraction et purification des plasmides amplifiés

Les plasmides amplifiés au sein des bactéries sont ensuite extraits à l'aide du Plasmid Plus Maxi Kit Qiagen. Pour commencer, le contenu de l'erlenmeyer utilisé pour l'étape final d'amplification est transvasé dans un grand tube adapté à une centrifugeuse. La culture bactérienne récoltée dans ce tube est centrifugée à 6000g pendant 15 minutes à 4°C. Après la centrifugation, le milieu est décanté et le culot bactérien est resuspendu avec le tampon P1 permettant l'élimination des protéines, de l'ADN et de l'ARN bactérien. Après homogénéisation, le tampon P2 est ajouté au tube contenant le lysat et incubé 3 minutes à température ambiante, puis le tampon S3 est ajouté au lysat et de nouveau incubé 10 minutes à température ambiante. Le lysat est filtré dans un nouveau tube à l'aide des cartouches, des pistons et des filtres fournis avec le kit. Le tampon BB est ajouté au lysat avant de transvaser celui-ci sur une colonne à filtre attachée à une citerne d'aspiration. Une fois tout liquide aspiré et l'ADN gardé par le filtre, du tampon ETR puis du tampon PE sont tour à tour ajoutés et aspirés afin de rincer l'ADN. La colonne à filtre est ensuite placée dans un tube collecteur et centrifugé à 10 000 g pendant une minute afin de supprimer complètement tout tampon de lavage résiduel. Pour terminer, la colonne est placée dans un nouveau tube collecteur et l'ADN est élué grâce à l'ajout d'eau dans la colonne qui est centrifugé avec le tube collecteur pendant une minute. Suite à la centrifugation, l'ADN est récolté dans le tube collecteur et la concentration du plasmide est mesurée à l'aide du Nanodrop (Matériel Table 2.2.).

### 2.3 Production de lentivirus

Les cellules HEK293T sontensemencées à 50 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans une boîte T75 contenant du DMEM-HG contenant 10% de SVF et 2 mM de glutamine, 24 heures avant la transfection. Un mix d'ADN composé de 0,4 µg du plasmide de protéine d'enveloppe (pCMV-VSVG), 3,6 µg du plasmide d'emballage (psPAX2) et 4 µg du plasmide d'expression shRNA inducible ciblant l'ARN messager de MPV17 est dilué dans 240µL d'opti-MEM. Une solution de lipofectamine composée de 16µL de Lipofectamine 2000 est dilué dans 240µL d'opti-MEM. Ces deux solutions sont incubées séparément pendant 5 minutes à température ambiante. Le mix d'ADN est combiné à la solution de lipofectamine pour former le mix de transfection. Ce dernier est incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont cotransfectées avec le mix de transfection à 37°C pendant 18 heures. 24 heures après la transfection, le milieu DMEM-HG est changé pour du milieu DMEM 1g/L de glucose contenant 10% de SVF (milieu adéquat pour les cellules Huh7 transduites plus tard). 48 et 72 heures après la transfection, le milieu contenant les lentivirus est recueilli et filtré avec un filtre de 0,45 µm (Matériel Table 2.3.).

### 2.4 Détermination du titre de lentivirus

Le titre de la suspension virale est déterminé par RT-qPCR à l'aide du Lentivirus qPCR Titer Kit. 2µl de la suspension virale sont ajoutés dans un tube contenant 18µl de Lysis Buffer pour



Table 2.4.1. Matériels pour la détermination du titre du virus

Matériel	Firmes	Références
Lentivirus qPCR Titer Kit <ul style="list-style-type: none"><li>- Virus Lysis Buffer</li><li>- Lentivirus standard 1 (STD1)</li><li>- Lentivirus standard 2 (STD2)</li><li>- Reagent-mix</li><li>- H<sub>2</sub>O</li></ul>	Applied Biological Materials	LV900
SYBR Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific	#4472908
MicroAmp Fast 96 wells	Applied Biosystem	#4346907

Table 2.4.2. Programme de la RTqPCR pour la détermination du titre du virus

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Reverse Transcription	42°C	20 mins	1
Enzyme Activation	95°C	10 mins	1
Denaturation	95°C	15 secs	30
Annealing/Extension	60°C	1 min	30

Table 2.5. Transduction lentivirale

Matériel	Firmes	Références
Cellules Huh7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
Flasque de culture T75	Corning	3276
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1g/L glucose	Life technologies	#31885-023
Plasmide pLKO.1-puro (shNT constitutif)	Sigma-Aldrich	SHCLNG-NM_00437
Plasmide pLKO.1-puro (shMPV17 constitutif)	Sigma-Aldrich	SH016-1EA
Plasmide pLKO-IPTG-3xLacO (shMPV17 inducible)	Sigma-Aldrich	#09301606MN
Sulfate de protamine	Sigma-Aldrich	P4020
Puromycine	Sigma-Aldrich	P8833

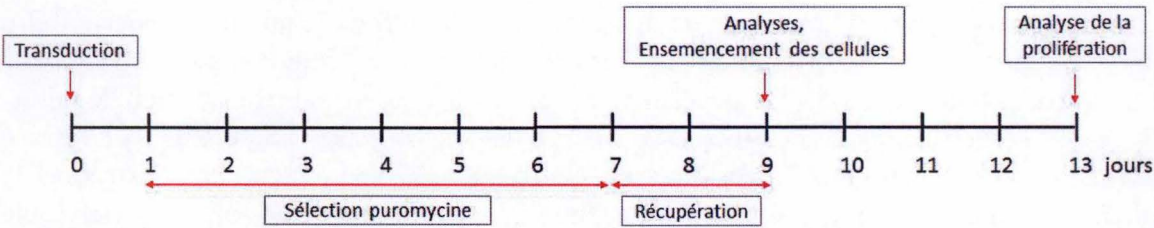


Figure 1. Ligne du temps d'une transduction lentivirale. Les cellules sont transduites avec les particules virales au J0. 24h après la transduction, les cellules transduites sont sélectionnées grâce à leur résistance à la puromycine pendant 6 jours. Au terme des 6 jours de sélection, il y a un temps de récupération de 2 jours. Les analyses biologiques ne commencent qu'au 9<sup>e</sup> jour post-transduction (JPT9). Lors de l'évaluation de la prolifération des cellules, celles-ci sont ensemencées au JPT9 et analysées quatre jours après ensemencement, au JPT13.



obtenir le lysat viral dilué 10 fois. Dans chaque puits de la plaque 96 puits, 10µl de Mastermix, 8µl de Reagent mix et 2µl de Lentivirus standard 1 ou de Lentivirus standard 2 ou de lysat viral ou d'eau (blanc) sont déposés.

La qPCR se déroule selon le programme repris dans la Table 2.4.2. et le titre est finalement calculé selon l'équation suivante : Titre du lysat viral =  $5 \times 10^7 / 2^{3(Ctx-Ct1)/(Ct2-Ct1)} \times 10$  (où Ctx = Moyenne des valeurs de 3 Ct de l'échantillon inconnu ; Ct1 = Moyenne de 3 Ct de STD1 ; Ct2 = Moyenne de 3 Ct de STD2) (Matériel Table 2.4.1.)

### 2.5 Transduction lentivirale

Les cellules Huh7 sontensemencées à 16 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans une boîte T75 24 heures avant la transduction. Les cellules sont transduites avec des lentivirus contenant un plasmide possédant une séquence de shRNA à expression constitutive ne ciblant aucun ARN messager (shNT Const ; shRNA non target constitutive) ou une séquence de shRNA à expression constitutive ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17 Const) ou une séquence de shRNA à expression inductible par de l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17 Ind). La transduction se fait avec une multiplicité d'infection (MOI) égale à 25 dans du milieu DMEM-LG 10% SVF frais contenant de la sulfate de protamine (60µg/mL). Le lendemain, les cellules transduites sont sélectionnées grâce à leur résistance à la puromycine (2,5 µg/mL) pendant 6 jours. Après la sélection de 6 jours, le milieu contenant la puromycine est remplacé par du milieu frais sans puromycine pour 2 jours de récupération (**Figure 1**). Les cellules transduites avec un vecteur d'expression shRNA inductible par IPTG (cellules Huh7 IPTG-shMPV17) sont traitées avec des concentrations indiquées d'IPTG pour le cours de temps indiqué (Matériel Table 2.5.)

### 3. Test de l'adaptation des shRNA constitutifs

#### *Principe*

Le travail de ce mémoire repose sur la caractérisation de la protéine MPV17 et de son implication dans la prolifération de cellules cancéreuses. Le phénotype prolifératif est intéressant étant donné que la répression de cette protéine mène à une diminution du taux de prolifération dans plusieurs lignées cancéreuses humaines. La méthode utilisée pour étudier ce phénotype est l'interférence par ARN en utilisant des shRNA constitutifs ciblant l'ARNm de MPV17 permettant la répression de celle-ci au niveau protéique. Cependant, l'observation de la perte du phénotype prolifératif au fur et à mesure des passages cellulaires. Ainsi pour mettre en évidence cette adaptation trois tests ont été systématiquement réalisés tout au long des passages cellulaires afin d'évaluer la perte progressive du phénotype prolifératif. Ces tests sont les tests MTT, pour évaluer le phénotype prolifératif par extrapolation de l'activité métabolique cellulaire et plus particulièrement de l'activité succinate déshydrogénase, les tests Folin, pour doser les protéines, et les temps de doublement basés sur les comptages manuels, pour évaluer le temps nécessaire à une population cellulaire à doubler son nombre.



### 3. Test de l'adaptation des shRNA constitutifs

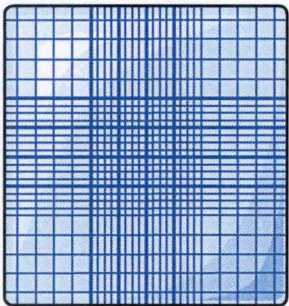
**Table 3.1. MTT Assay**

Matériel	Firmes	Références
Cellules Huh7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
Plaque 24 puits	Costar	3524
MTT	Sigma	M2128
Tampon de lyse pour MTT <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dodécylsulfate de sodium 30%</li> <li>- N, N-diméthylformamide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Merck</li> <li>- Sigma-Aldrich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 06022</li> <li>- D4551</li> </ul>
Mark Microplate Spectrophotometer	BioRad	#10062

**Table 3.2. Folin Protein Assay**

Matériel	Firmes	Références
Cellules Huh7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
Plaque 24 puits	Costar	3524
NaOH 0,5 N	Merck	6498
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent	Merk	#564825
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2%	Sigma-Aldrich	S2226
Tartrate de sodium et potassium 2%	Merck	8087
CuSO <sub>4</sub> 1%	Merk	2790
Spectromètre	Ultraspec 8000	#29003612

**Table 3.3. Comptage manuel**

Matériel	Firmes	Références
Cellules Huh7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
Plaque 6 puits	Costar	#3516
Cellules de Neubauer 	Marienfeld	0640011



### 3.1 Test MTT

#### *Principe*

Le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est utilisé comme réactif dans ce test de numération des cellules vivantes par la mesure de leur activité métabolique. Le groupement tétrazolium contenu dans le réactif est réduit par la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale, des cellules vivantes actives métaboliquement. Cette réaction permet la formation de formazan, un précipité de couleur mauve. Ainsi, la quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et plus particulièrement à leur activité métabolique.

#### *Méthode*

Les cellules Huh7 sontensemencées dans une plaque 24 puits à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, jour 1 (J1) afin de normaliser, et quatre jours (J4) plus tard, 500 µl de MTT (2,5 mg/ml) sont déposés dans chaque puits et incubés à 37°C pendant 2 heures. Les cellules sont ensuite lysées avec un tampon de lyse à 37°C pendant au minimum 1 heure. La densité optique lue avec un spectrophotomètre à 570 nm permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement (Matériel Table 3.1.).

### 3.2 Dosage protéique de Folin

#### *Principe*

Le noyau phénolique des résidus de tyrosine est capable de réduire le réactif de Folin en milieu alcalin. Cette réaction permet d'obtenir une coloration bleue et de faire ainsi un dosage colorimétrique. Du sulfate de cuivre est ajouté afin de rendre la réaction plus sensible et favoriser le transfert d'électron.

#### *Méthode*

Les cellules Huh7 sontensemencées dans une plaque 24 puits à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, jour 1 (J1) afin de normaliser, et quatre jours (J4) plus tard, le milieu de chaque puits est décanté, les cellules sont rincées au PBS et 150 µl de NaOH 0,5 N sont déposés dans chaque puits puis les cellules sont incubées à température ambiante pendant 45 minutes sous agitation. Les 150µL de lysat de chaque puits sont individuellement transférés dans un tube à Bradford et chaque lysat est mis en présence de 750µL d'une solution contenant du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, du Tartrate de sodium et potassium 2% et du CuSO<sub>4</sub> 1% (ratio 100/1/1) qui va servir à neutraliser le NaOH et permettre la formation de complexes, et incubés pendant 10 minutes, ensuite avec 75µL de Folin Reagent dilué deux fois dans de l'eau et incubé pendant 30 minutes. La densité optique est finalement lue avec un spectrophotomètre à 740 nm (Matériel Table 3.2.).

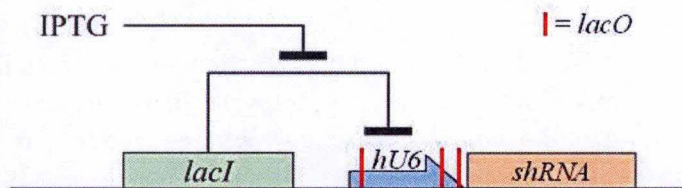
### 3.3 Temps de doublement

#### *Principe*

Le temps de doublement est le temps nécessaire à une population pour doubler sa valeur. Ici il est basé sur le nombre de cellules et permet de déterminer le taux de prolifération cellulaire.



#### 4. Optimisation des concentrations d'IPTG pour l'expression inducible de shMPV17



**Figure 2. Principe de l'induction du shRNA par la présence d'IPTG.** Le promoteur U6 humain (hU6) contrôle l'expression du shRNA et se trouve entre des séquences *lacO*. L'IPTG est capable de se lier au *lacI* qui n'est plus capable d'inhiber le *lacO* et empêcher hU6 d'induire l'expression du shRNA. Ainsi, en présence d'IPTG, le shRNA sera exprimé (Stamatakis and Mantzaris, 2009).

**Table 4.1. Détermination de la concentration toxique de l'IPTG**

Matériel	Firmes	Références
Cellules Huh7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
Plaque 24 puits	Costar	3524
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1g/L glucose	Life technologies	#31885-023
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Sigma-Aldrich	I6758-1G

**Table 4.2. Détermination de la concentration efficace de l'IPTG**

Matériel	Firmes	Références
Cellules Huh7	JCRB Cell Bank	JCRB0403
Flasque de culture		
- 75cm <sup>2</sup> (T75)	- Corning	- #3276
- 25cm <sup>2</sup> (T25)	- Corning	- #430639
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1g/L glucose	Life technologies	#31885-023
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Sigma-Aldrich	#16758



**Méthode**

Les cellules Huh7 sont ensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de 8 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le lendemain, jour 1 (J1) afin de normaliser, et quatre jours (J4) plus tard, les cellules sont comptées manuellement à l'aide d'une cellule de Neubauer. Pour ce faire, chaque puits est décanté puis les cellules sont rincées au PBS et décrochées des puits grâce à la trypsinisation. Les cellules en suspension sont ensuite suspendues dans du nouveau milieu et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est décanté pour ne garder que le culot cellulaire qui est resuspendu dans du nouveau milieu. 10µL de cellules resuspendues sont introduits dans chaque chambre de la cellule de Neubauer qui contient chacune 4 quadrants (Matériel Table 3.3.). Après avoir compté manuellement le nombre de cellules totales par condition, le temps de doublement (DT) est calculé à partir du nombre de cellules ensemencées au départ (d) et du nombre de cellules finales (f) en prenant en compte le temps en heure (t) qui sépare ces deux comptages manuels à l'aide de l'équation suivante :

$$DT = \frac{t \times \ln(2)}{\ln(f) - \ln(d)}$$

**4. Optimisation des concentrations d'IPTG pour l'expression inductible de shMPV17****Principe**

L'IPTG est un analogue du lactose qui sert ici d'agent inducteur. Le plasmide pLKO-IPTG-3xLacO contient une séquence de shRNA qui est sous le contrôle d'un promoteur U6 se situant entre des séquences LacO (Opérateur). Ces séquences LacO sont elles-mêmes sous le contrôle de LacI (Inhibiteur) qui se lie continuellement à LacO et empêche le promoteur d'induire la transcription du shRNA. L'IPTG est capable de se lier au LacI et de bloquer sa fonction. Ainsi, en absence d'IPTG, le shRNA ne sera pas exprimé, tandis qu'en présence de celui-ci, le shRNA sera exprimé et pourra dégrader l'ARNm cible permettant ainsi d'induire le silençage de la protéine MPV17 au moment voulu (**Figure 2**).

**Méthodes****4.1 Détermination de la concentration toxique de l'IPTG**

Les cellules Huh7 shMPV17 inductible sont ensemencées dans une plaque de 24 puits à une densité de 7500 cellules/cm<sup>2</sup> dans un milieu DMEM-LG 10% SVF contenant des concentrations croissantes (0 - 0,1 - 1 - 10 mM) d'IPTG pendant 1 à 5 jours. La viabilité cellulaire est ensuite déterminée sur base d'une extrapolation de l'activité métabolique des cellules (cfr 3.1. Méthode Test MTT) (Matériel Table 4.1.).

**4.2 Détermination de la concentration efficace de l'IPTG**

Pour optimiser la concentration d'IPTG et le temps nécessaire pour une diminution efficace de la protéine MPV17, les cellules Huh7 shMPV17 inductible et Huh7 non transduites (NT) sont ensemencées à 6500 cellules/cm<sup>2</sup> dans des boîtes T25 contenant un milieu DMEM-LG 10% SVF et différentes concentrations d'IPTG. Des extractions de protéines et d'ARN ont été effectuées après 2 et 5 jours pour chaque condition afin de déterminer la concentration efficace d'IPTG permettant de provoquer une diminution d'abondance de la protéine MPV17. Une fois la concentration efficace déterminée, les tests pour évaluer le phénotype antiprolifératif des



## 5. Western Blot

**Table 5.1. Extraction protéique**

Matériel	Firmes	Références
PBS	Merk	
Tampon RIPA <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris 25 mM</li> <li>- NaCl 150 mM</li> <li>- 1% NP40</li> <li>- 1% de désoxylate de sodium</li> <li>- 0,1% de SDS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Merk</li> <li>- Merk</li> <li>- Sigma-Aldrich</li> <li>- Merk Millipore</li> <li>- AppliChem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 8382</li> <li>- 6404</li> <li>- 74385-1L</li> <li>- 6504</li> <li>- 13942</li> </ul>
Cocktail inhibiteur de protéase (PIC)	Sigma-Aldrich	
Tampon inhibiteur de phosphatase (PIB) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 25 mM</li> <li>- PNPP (4-nitrophenylphosphate) 250 mM</li> <li>- β-glycerophosphate 250 mM</li> <li>- NaF 125 mM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sigma-Aldrich</li> <li>- Sigma-Aldrich</li> <li>- VWR</li> <li>- Merck</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1000979242</li> <li>- 016K5302</li> <li>- 27874295</li> <li>- 654883</li> </ul>
Sonicateur	Hielscher	5831359
Centrifugeuse	Eppendorf	09468

**Table 5.2. Dosage protéique Pierce**

Matériel	Firmes	Références
Bovine Serine Albumin (BSA) 2µg/µl	Europa BioProduct	EQBAH65-1000
Pierce 660 Protein Assay reagent	Thermo Fisher Scientific	N°22660
Ion Detergent Compatibility Reagent	Thermo Fisher Scientific	#22663
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One	655101
Mark Microplate Spectrophotometer	Bio-Rad	10062

**Table 5.3. Eletrophorèse**

Matériel	Firmes	Références
Bleu de β-mercaptoéthanol <ul style="list-style-type: none"> <li>- β-mercaptoéthanol</li> <li>- Dodécylsulfate de sodium</li> <li>- Bleu de bromophénol</li> <li>- Glycérol 85%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fluka</li> <li>- Merk</li> <li>- Janssen</li> <li>- Merk</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 63590</li> <li>- 06022</li> <li>- 1513503</li> <li>- 04094</li> </ul>
Coloration Protein Standard Broad Range	BioLabs	P7712S
Tampon de migration <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris 25mM</li> <li>- Glycine (0,192M)</li> <li>- SDS 0,1%</li> <li>- H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Merk Millipore</li> <li>- Merk Millipore</li> <li>- AppliChem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 8382</li> <li>- 4201</li> <li>- 13942</li> </ul>
Gel Bio-Rad 4-20%	Bio-Rad Laboratories	N°456-1093
Gel Bio-Rad 12%	Bio-Rad Laboratories	N°456-1043
Electrophorèse	Pharmacia Biotech	19350000



cellules ont été réalisés. Ces tests sont les trois mêmes tests que ceux utilisés pour observer l'adaptation des cellules Huh7 au shRNA constitutif c'est-à-dire, le test MTT, le dosage protéique de Folin et le temps de doublement (Méthodes 3.1., 3.2., 3.3, Matériel Table 4.2.).

### 5. Western Blot

#### *Principe*

Le Western Blot est une technique permettant la quantification relative de protéines provenant d'extraits cellulaires. Cette technique est basée sur la capacité des anticorps à reconnaître de façon spécifique un épitope présent à la surface des protéines. Pour ce faire, les protéines sont préalablement extraites et dosées puis dénaturées à l'aide du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du dodécylsulfate de sodium (SDS) permettant aux protéines d'être séparées en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de polyacrylamide. Un transfert des protéines du gel à une membrane est ensuite réalisé. Pour terminer, la révélation des protéines d'intérêt est possible grâce à l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques ainsi que d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome capable de reconnaître l'anticorps primaire permettant la visualisation de la présence de la protéine cible.

#### *Méthodes*

##### 5.1 Extraction protéique

Les cellules sont rincées rapidement une fois avec du PBS avant d'être lysées avec 50 ou 70  $\mu$ L de tampon RIPA, contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (PIC) et de tampon inhibiteur de phosphatases (PIB), par T25. Une fois lysées, les cellules sont récupérées et incubées sur de la glace. Les échantillons sont ensuite soniqués 3 fois pendant 10 secondes afin de perturber les membranes cellulaires et permettre au contenu protéique d'être libéré. Finalement les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 tr/min à 4°C (Matériel Table 5.1.).

##### 5.2 Dosage protéique

Le surnageant contenant les protéines extraites précédemment est recueilli et la concentration de protéines est déterminée en utilisant un réactif de dosage de protéines Pierce 660nm. Le dosage se fait dans une plaque 96 puits. Une courbe d'étalonnage basée sur des échantillons d'albumine sérique bovine (bovine serum albumin, BSA) de concentrations croissantes et connues (0 - 0,5 - 1 - 2 - 5 - 10  $\mu$ g/ $\mu$ L) est utilisée afin de déterminer la concentration des extraits protéiques. Par puits, chaque extrait protéique dilué 10 fois avec de l'eau est analysé en triplicat. Un blanc de ces extraits protéiques est basé sur le tampon RIPA utilisé lors de la lyse protéique dilué 10 fois. 150  $\mu$ L de Pierce Reagent contenant du Ionic Detergent Compatibility Reagent (IDCR) (1g d'IDCR/20ml de Pierce) est ajouté à chaque puits contenant un échantillon puis incubé à température ambiante pendant 5 minutes minimum à l'obscurité. Finalement l'absorbance des échantillons est lu à 660 nm par spectrophotomètre. Les extraits protéiques sont ensuite aliquotés et stockés à -80 ° C (Matériel Table 5.2.).

##### 5.3 Électrophorèse

Les échantillons sont préparés de sorte à obtenir 25 à 40  $\mu$ g de protéines, selon la concentration des protéines, mis en présence de tampon de charge composé de  $\beta$ -mercaptoéthanol, de SDS,



**Table 5.4. Transfert des protéines sur membrane**

Matériel	Firmes	Références
Transfer Pack Nitrocellulose Starter Kit	Bio-Rad Laboratories	#1704159
Trans-Blot Turbo RTA Mini Nitro Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories	#1704270
Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories	#1704272
PBS	Merck	
Méthanol	Merck	07018
Transfer Buffer 1x <ul style="list-style-type: none"><li>- Transfer Buffer 5x</li><li>- Ethanol 100%</li><li>- H<sub>2</sub>O</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Bio-Rad</li><li>- Merk Millipore</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- #10026938</li><li>- 64275</li></ul>
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories	690BR019315

**Table 5.5. Révélation des protéines**

Matériel	Firmes	Références
SuperSignal Western Blot Enhancer <ul style="list-style-type: none"><li>- Antigen Pretreatment Solution</li><li>- Primary Antibody Diluent</li></ul>	Thermo Scientific	#46640
Odyssey Blocking Buffer	LI-COR Biosciences	92740000
Tween 20	Bio-Rad Laboratories	#1706531
Odyssey Infrared Imager	LI-COR Biosciences	9120

**Table 5.6. Anticorps utilisés pour le Western Blot**

Protéines	Source	Clonalité	Dilution	Firmes	Références
MPV17	Lapin	Polyclonal	1 : 500 1 : 1000	Proteintech Europe	N°10310-1-AP
ATF4	Lapin	Monoclonal	1 : 1000	Cell Signaling	11815S
MNK1	Lapin	Monoclonal	1 : 1000	Cell Signaling	2195S
Tubulin	Souris	Monoclonal	1 : 10 000	Sigma-Aldrich	T51685ML
Actine	Souris	Monoclonal	1 : 10 000	Sigma-Aldrich	A5441
Anti-lapin 800 nm	Chèvre	Polyclonal	1 : 10 000	LI-COR Biosciences	C50602-08
Anti-souris 700 nm	Chèvre	Polyclonal	1 : 10 000	LI-COR Biosciences	92668070



de bleu de bromophénol et de glycérol, afin de dénaturer les protéines, et dilués avec de l'eau si nécessaire afin d'obtenir un volume total de 15 ou 22 $\mu$ L. Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Après avoir chargé chaque échantillon dans un puits, les protéines sont séparées sur un gel Bio-Rad 4-20% ou 12% (10 puits) par électrophorèse avec un courant de 150 V, 400mA et 60 W pendant 45 à 50 minutes (Matériel Table 5.3.).

### 5.4 Transfert des protéines sur membrane

Les protéines ayant migré par électrophorèse sont ensuite transférées sur une membrane de Nitrocellulose à l'aide du Transfer Pack Nitrocellulose Starter Kit contenant deux transfer stacks et une membrane Nitrocellulose pré-imbibées dans du tampon d'électrophorèse ou à l'aide du Trans-Blot Turbo RTA Mini Nitro ou PVDF Transfer Kit contenant des membranes Nitrocellulose ou PVDF, des transfer stacks et du Transfert Buffer 5x. Pour ce second kit, les membranes et les transfer stacks ne sont pas pré-imbibés et nécessitent une préparation consistant en une incubation de la membrane Nitrocellulose dans du PBS pendant 10 minutes ou dans du méthanol pendant 1 minute pour la membrane PVDF afin de les hydrater. Les transfer stacks et la membrane sont ensuite immergés 5 minutes dans du Transfer Buffer 5x dilué avec de l'éthanol 100% et de l'eau milliQ afin d'obtenir du Transfer Buffer 1x. Une fois que les protéines ont migré dans le gel selon leurs poids moléculaires, la cassette de la machine Trans-Blot Turbo pourra contenir un montage composé de bas en haut d'un premier transfert stack, du gel, de la membrane et du second transfert stack, dans cet ordre car un courant d'une intensité de 2,5A sera appliqué à ce montage pendant 3 minutes par membrane de haut en bas, ce qui permettra aux protéines d'être transférées du gel à la membrane (Matériel Table 5.4.).

### 5.5 Révélation des protéines

La membrane peut être traitée avec du SuperSignal Western Blot Enhancer lorsque cela est nécessaire, afin d'augmenter la détection de certaines protéines. Ce traitement consiste en 2 minutes de lavage dans de l'eau, deux rinçages rapides avec de l'eau, une incubation avec l'Antigen Pretreatment Solution pendant 10 minutes et cinq rinçages rapides avec de l'eau. La prochaine étape est le blocage de la membrane. Cette étape consiste en un blocage des sites d'interactions non spécifiques afin de minimiser les interactions entre la membrane et les anticorps. Elle se déroule après le prétraitement de la membrane avec le SuperSignal Western Blot Enhancer ou directement après le transfert si le prétraitement n'est pas nécessaire. La membrane est incubée avec de l'Odyssey Blocking Buffer dilué avec du PBS (ratio ½) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Après le blocage, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué dans de l'Odyssey Blocking Buffer contenant du Tween 20 à 0,1%, ou dans le Primary Antibody Diluent si la membrane a été prétraitée avec l'Antigen Pretreatment Solution, pendant la nuit à 4°C sous agitation. La membrane est rincée 3 fois 5 minutes avec du PBS-Tween 20 0,1% avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire dilué dans du Odyssey Blocking Buffer contenant Tween 20 0,1% pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. La membrane est rincée 3 fois 5 minutes avec du PBS-Tween 20 0,1% et deux fois rapidement dans du PBS seul. Enfin, la membrane est séchée à l'obscurité à 37°C pendant au moins 1 heure, puis scannée avec l'Odyssey Infrared Imager utilisant le programme Odyssey V3.0 associé. L'intensité de la fluorescence de la protéine est normalisée avec l'intensité de la fluorescence de la tubuline ou de l'actine et quantifiée à l'aide du programme Odyssey V3.0 (Matériel Table 5.5., Anticorps Table 5.6.).



## 6. RT-PCR en temps réel

**Table 6.1. Extraction d'ARN**

Matériel	Firmes	Références
RNeasy Mini Kit <ul style="list-style-type: none"><li>- RLT Buffer</li><li>- RPE Buffer</li><li>- RWI Buffer</li><li>- Ethanol 70%</li><li>- H<sub>2</sub>O</li></ul>	Qiagen	#74104
DNase <ul style="list-style-type: none"><li>- Buffer RDD</li><li>-</li></ul>	- QIAgen	- 1010397
QIAcube	Qiagen	10187
NanoDrop-1000	Isogen Life Science	9742

**Table 6.2. Transcription inverse**

Matériel	Firmes	Références
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit <ul style="list-style-type: none"><li>- Oligo (dT) Primer</li><li>- Transcription RT Reaction Buffer</li><li>- Transcriptor Reverse Transcriptase</li><li>- Protector RNase Inhibitor</li><li>- Nuclease Free Water</li></ul>	Roche Life Science	#04896866001
GoScript™ Reverse Transcriptase <ul style="list-style-type: none"><li>- Enzyme mix</li><li>- Buffer Mix Oligo dT</li><li>- Nuclease Free Water</li></ul>	Promega	A2791
Thermocycler	Eppendorf	5345



## 6. RT-PCR en temps réel

### *Principe*

La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel ou PCR quantitative (qPCR), est une technique permettant de déterminer la quantité relative d'une séquence d'ADN afin de connaître le niveau d'expression d'un gène cible au niveau du transcrit. L'ARN est préalablement extrait et rétrotranscrit en ADN complémentaire simple brin (ADNc). Une fois cette étape accomplie, la PCR peut être effectuée à partir de l'ADNc obtenu. La première étape de la qPCR consiste en une synthèse, catalysée par la polymérase, du second brin de l'ADNc à partir du premier brin. Ensuite, l'ADNc double brin est amplifié grâce à la réaction en chaîne par polymérase. Durant cette étape d'amplification, du SYBR Green, un colorant intercalant, est incorporé dans l'ADN double brin. Le niveau auquel la fluorescence est détectable est appelé le cycle de seuil (Ct). Une quantification relative du gène cible est finalement possible en comparant l'expression du gène cible par rapport à un gène de référence d'expression stable.

### *Méthodes*

#### 6.1 Extraction d'ARN

Les cellules sont lysées dans 350µL de tampon RLT par T25 puis le lysat cellulaire est transvasé dans des tubes 2 ml. La suite de cette étape est totalement automatisée grâce au QIAcube. Ainsi, l'ARN est isolé des différentes conditions en utilisant le RNeasy Mini Kit et le QIAcube. L'ARN extrait et purifié est ensuite recueilli dans des tubes et prêt pour la transcription inverse. La concentration d'ARN est déterminée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop-1000 (Matériel Table 6.1.).

#### 6.2 Transcription inverse

L'ADN complémentaire (ADNc) est généré à partir de l'ARN total extrait précédemment en utilisant le Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit ou le GoScript Reverse Transcriptase Kit dans des conditions RNase free pour éviter la dégradation de l'ARN.

Avec le kit Roche, une quantité totale de 2µg d'ARN est mélangée avec 1 µL d'Oligo (dT) Primer et de l'eau Nuclease Free afin d'obtenir 13µL de volume total. Le mix est incubé pendant 10 minutes à 65°C. Puis 7µL du mix principal composé du Transcription RT Reaction Buffer, de la Transcriptor reverse transcriptase, de l'inhibiteur Protector RNase et du mix de dNTP est ajouté dans le tube contenant l'ARN. Ce mélange final est ensuite incubé à 50°C pendant 1 heure et à 85°C pendant 5 minutes. Les échantillons d'ADNc sont stockés à -20°C.

Avec le kit Promega, une quantité totale de 2µg d'ARN est diluée dans de l'eau Nuclease Free afin d'obtenir un volume total de 12µL. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 70°C afin de dénaturer l'ARN. Puis 8µL du mix principal composé du Buffer Mix Oligo dT, d'enzymes reverse transcriptase et d'inhibiteur de RNase et d'eau Nuclease free est ajouté dans le tube contenant l'ARN. Ce mix final est ensuite placé dans le thermocycler. À l'intérieur de celui-ci les échantillons seront incubés à 25°C pendant 5 minutes pour permettre l'hybridation des primers, ensuite à 42°C pendant 60 minutes pour permettre l'extension des ADNc et à 70°C pendant 15 minutes pour inactiver la réaction. Les échantillons d'ADNc sont stockés à -20°C (Matériel Table 6.2.).



**Table 6.3.1. Matériels utilisés pour la PCR en temps réel**

Matériel	Firmes	Références
SYBR Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific	#4472908
GoTaq qPCR Master	Promega	A6002
StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific	272007375
StepOnePlus Software 2.3.		
Amorces MPV17		
- Forward Primer	- IDT	- 66421172
- Reverse Primer	- IDT	- 66421173
Amorces Tubulin		
- Forward Primer	- IDT	- 73862106
- Reverse Primer	- IDT	- 73862107
MicroAmp Fast 96 well	Applied Biosystem	4346907

**Table 6.3.2. Programme de la RTqPCR**

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
Activation Enzyme	95°C	2 mins	1
Denaturation	- 95°C - 60°C	- 15 secs - 1 min	40
Hybridation/Extension	- 95°C - 60°C - 95°C	- 15 secs - 1 min - 15 secs	1

**Table 6.3.3. Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel**

Gene	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
MPV17	5'- GCTCAGGAAGCATGGCACTCT - 3'	5'- AATGTCACCCAGGCCCATCA - 3'
Tubulin	5'- CAGGGAGGTGGACCCAGAAC - 3'	5'- CCCGAGGGGCACTACACCAT - 3'

## 7. Marquage Immunofluorescence

**Table 7.1. Marquage Immunofluorescence**

Matériels	Firmes	Références
Paraformaldehyde (PFA) 4%	Merck	04005
PBS-Triton 1%PBS		
- PBS	- Merck	
- Triton X100	- Merck	
PBS-BSA 2%		
- PBS	- Merk	
- Bovin Serum Albumine (BSA)	- Europa BioProduct	- EQBAH65-1000
TO-PRO 3	Invitgenr	#T-3605
Microscope Slides	VWR	631 0910
Microscope Cover Glasses	Assistent	41001113
Mowiol	Sigma	MFC000081922
Microscope confocal	Leica	



### 6.3 PCR en temps réel

Les échantillons d'ADNc sont dilués 50 fois dans de l'eau MilliQ. Un mix composé des amorces forward et reverse du gène étudié (300 nM) (Séquences des amorces Table 6.3.3.), du SYBR Select Master Mix et d'eau MilliQ est préparé. 20µL ou 16µL du mix d'amorces et 5µL ou 4µL d'ADNc dilué 50x sont déposés par puits dans une plaque à 96 puits. La plaque est ensuite scellée et centrifugée à 1200 tr/min pendant 1 minute et analysée à l'aide de l'instrument StepOnePlus et du programme StepOnePlus (Table 6.3.2.). La tubuline est utilisée comme gène de référence. L'expression relative de l'ARN est calculée en fonction de la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalisée pour la tubuline (où  $\Delta CT = Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène ménage}$ ;  $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ échantillon test} - \Delta CT \text{ échantillon témoin}$ ) (Matériel Table 6.3.1.).

## 7. Immunofluorescence

### *Principe*

L'immunofluorescence est une technique basée sur le principe d'immunomarquage et est utilisée pour déterminer la présence et la localisation d'une protéine d'intérêt dans la cellule. Ce principe repose sur la capacité d'un anticorps à reconnaître un épitope d'une protéine de façon spécifique. Pour ce faire, les cellules sont fixées puis perméabilisées afin que l'anticorps primaire ciblant la protéine étudiée puisse pénétrer dans la cellule. L'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome vient reconnaître l'anticorps primaire permettant ainsi de visualiser la présence et la localisation de la protéine cible à l'aide d'un microscope confocal.

### *Méthode*

Les cellules sontensemencées dans une plaque de 24 puits à une densité de 12 500 cellules/cm<sup>2</sup> le jour avant le marquage par l'immunofluorescence. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldehyde à 4% (PFA) pendant 10 minutes et rincées 3 fois avec du PBS avant que les cellules ne soient perméabilisées avec du PBS-Triton 1% pendant 5 minutes. Après la perméabilisation, les cellules sont lavées 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS-BSA 2% puis incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 2% à 4°C dans l'obscurité pendant la nuit. Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS-BSA 2% avant l'incubation avec l'anticorps secondaire dilué dans PBS-BSA 2%, à température ambiante dans l'obscurité. Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS-BSA 2% et une fois avec du PBS avant l'incubation avec le TO-PRO 3 pendant 30 minutes pour la coloration des noyaux. Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS avant le montage de la lamelle avec la solution de Mowiol (Sigma). Les lamelles sont laissées à 4°C pendant la nuit pour la solidification du montage. (Matériel Table 7.1. et 7.2.). Une quantification du marquage par immunofluorescence des protéines SMADs a été calculée sur la base de la différence d'intensité de fluorescence des protéines dans le noyau des cellules shMPV17 par rapport aux cellules shNT dans plus de 100 cellules par condition expérimentale, excepté pour SMAD2 (nombre de cellules  $\approx$  60), en utilisant le logiciel Image J.



**Table 7.2. Anticorps utilisés en Immunofluorescence**

Protéines	Source	Clonalité	Dilution	Firmes	Références
SMAD2	Lapin	Monoclonal	1 : 100	Cell Signaling	#5339P
SMAD3	Lapin	Monoclonal	1 : 100	Cell Signaling	#9523P
SMAD3-P	Lapin	Monoclonal	1 : 100	Cell Signaling	#9520P
SMAD4	Lapin	Monoclonal	1 : 100	Cell Signaling	#9515P
Anti-lapin Alexa 488nm	Chèvre	Polyclonal	1 : 1000	Thermo Fisher Scientific	A11008

**Table 8. Transfection**

Matériels	Firmes	Références
Lipofectamine 2000	Invitrogen	#11669-019
Plasmide pEGFP-N1	Clontech	6085-1
Plasmide pRL-SV40	Promega	E2231
Plasmide SBE4-Luc	Addgene	#16495
Dual Kit Luciferase - Passive Lysis Buffer - Luciferase Assay Reagent - Stop & Glo Reagent	Promega	E1910
Tubes Lumac	Sarstedt	55476
Lucetta Luminometer	Lonza	71120026
Fluoroskan Ascent	Thermo Electron Corp	11400222



## 8. Transfection

### *Principe*

Une transfection est un procédé consistant en l'introduction d'ADN exogène dans une cellule eucaryote n'utilisant pas un virus comme vecteur de transfection. Elle peut être effectuée par différentes méthodes dont une est basée sur l'utilisation de lipides cationiques formant des liposomes avec l'ADN exogène. Ces liposomes fusionnent avec les membranes des cellules eucaryotes, libérant l'ADN exogène dans la cellule eucaryote.

### *Optimisation*

Pour cette optimisation plusieurs conditions de trois paramètres furent testées : la densité de cellules qui subiront la transfection (20 000, 25 000, 30 000 ou 35 000 cellules/cm<sup>2</sup>), le ratio de µg de plasmide par µl d'agent transfectant (0,5µg/1µL, 0,5µg/2,5µl, 0,8µg/4µl) et la présence ou l'absence de sérum dans le milieu de transfection.

Le jour avant la transfection, les cellules sontensemencées dans une plaque de 24 puits à une des quatre densités testées. Les cellules sont transfectées avec de la lipofectamine, qui sert d'agent transfectant, et un plasmide exprimant le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein), qui sert de gène rapporteur de transfection, dans un milieu DMEM-LG avec ou sans sérum. Si la transfection s'est déroulée dans un milieu sans sérum, celui-ci devra être remplacé par du milieu avec sérum 4 heures plus tard. 24 heures après la transfection, les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence. L'efficacité de transfection peut ensuite être mesurée en utilisant un fluorimètre, une fois que les cellules ont été lysées. Pour ce faire, les cellules sont rincées au PBS, et lysées avec du Passive Lysis Buffer 1x (100µl/puits) puis transvasées dans un tube avant d'être centrifugées pendant 3 minutes à 13 000 rpm. Pour finir, 80µl de surnageant sont récupérés et déposés dans une plaque 96 puits. Pour finir, l'analyse de la fluorescence des échantillons se fait à l'aide d'un fluorimètre.

### *Méthode*

Les cellules sontensemencées dans une plaque de 24 puits à une densité de 25 000 cellules/cm<sup>2</sup> le jour avant la transfection. Les cellules sont transfectées avec la lipofectamine, qui sert d'agent transfectant, et un mix d'ADN avec un ratio de 2,5µL de lipofectamine pour 0,5µg de mix d'ADN par puits. Le mix d'ADN se compose des plasmides pRL-SV40, contenant la luciférase *Renilla*, et SBE4-Luc contenant la luciférase *Firefly*, avec un ratio de 1/50. Après 24 et 48h de transfection, la révélation de la luciférase est effectuée à l'aide du Dual Kit Luciferase. Pour la révélation luciférase utilisant ce kit, les cellules sont rincées deux fois au PBS avant d'être lysées avec le Passive Lysis Buffer (PLB) sous agitation pendant 15 minutes. Chaque lysat est ensuite transvasé dans un eppendorf et centrifugé à 13 000 rpm pendant 3 minutes. Le surnageant de chaque lysat est à nouveau transvasé dans des tubes Lumac cette fois, contenant de la Luciferase Assay Reagent (LAR). Une première lecture au luminomètre permettant d'identifier l'unité relative de lumière (relative light unit, RLU) de la luciférase *firefly* indiquant la condition luciférase de l'expérience est réalisée. La solution Stop & Glo Reagent est ensuite ajoutée le plus rapidement possible dans le tube Lumac contenant le lysat et le LAR et lu une seconde fois afin d'obtenir le RLU de la luciférase *renilla* indiquant la condition luciférase de base. La mesure de l'échantillon est calculé en faisant le rapport de RLU *firefly* sur le RLU *renilla* (Matériel Table 8).



**Table 9. Supplémentation au N-acétylcystéine**

<b>Matériels</b>	<b>Firmes</b>	<b>Références</b>
N-acétylcystéine	Sigma-Aldrich	A9165



### 9. Supplémentation au N-acétylcystéine

Des cellules Huh7 transduites avec un shNT ou un shMPV17 constitutif ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits à une densité de 8 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans un milieu avec différentes concentrations (0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 mM) de N-acétylcystéine (NAC) pendant 4 jours avec un changement de milieu tous les 2 jours. La prolifération cellulaire a été déterminée sur la base de la teneur en protéines de chaque échantillon par un test de Folin (Méthode au point 3.2.) à la fin des 4 jours (Matériel Table 9).



### III. RESULTATS



Upstream Regulator	Expr Log Ratio	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules in dataset
beta-estradiol			0,457	5,71E-29	AARS, ABCA1, ABC... all 499
MYC	-1,165	Inhibited	-4,635	6,13E-27	ABCA1, ABCA2, AC... all 333
ESR1	0,451	Activated	6,025	8,15E-27	ABCB1, ABCG5, AB... all 381
HNF4A	0,288	Inhibited	-2,698	2,44E-23	ABCG5, ABCG8, AC... all 534
TGFB1	1,175	Activated	7,144	1,13E-20	ABCA1, ABLIM3, A... all 451
MYCN	0,429	Inhibited	-8,945	3,52E-19	ABCA1, ABCA2, AB... all 112
TP53	-0,464		1,884	7,35E-19	ABAT, ABCB1, ABH... all 401
ERBB2	0,279		0,110	3,15E-18	ABRACL, ACAA2, A... all 227
CST5	∞		0,032	9,26E-16	ABLIM1, ADSL, AH... all 105
HRAS	-0,150		-1,206	1,05E-15	ACTA1, ADM, ADR... all 181
KRAS	-0,060	Inhibited	-2,126	2,61E-15	ABCA1, ACTR3, AHR... all 151
methylprednisolone			0,218	1,15E-14	ABAT, ABCC9, AHCY... all 167
ATF4	-0,511	Inhibited	-2,792	1,38E-14	AARS, ABCA1, ABCG5... all 68
dexamethasone		Activated	2,070	2,59E-14	ABCB1, ABHD2, AC... all 421
PDGF BB			1,215	3,22E-14	ACTA2, ADD3, ADM... all 113

**Figure 1. Upstream Regulators prédits dans les gènes différentiellement exprimés dans les cellules Huh7 silencées pour MPV17 (Données de séquençage d'ARN).** Le séquençage d'ARN a été réalisé sur des cellules Huh7 transduites avec un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17) ou ne ciblant aucune séquence (shNT). Ce séquençage d'ARN a été réalisé par M. Canonne au Genomics Core KU Leuven sur quatre réplicats biologiques indépendants. Dans cette figure est représenté le top 15 des Upstream Regulators dont TGFβ1 et ATF4. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Ingenuity® Pathway Analysis software (IPA). Le régulateur TGFβ1 est prédit comme étant dans un état activé tandis que le régulateur ATF4 est prédit comme étant dans un état inhibé.



## III. Résultats

### Partie I : Etude des mécanismes moléculaires par lesquels la diminution de la protéine MPV17 ralentit la prolifération des cellules cancéreuses

Cette partie de l'étude se concentre sur le rôle de MPV17 dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses et des mécanismes moléculaires impliqués qui pourraient expliquer le phénotype prolifératif observé dans les cellules silencées pour MPV17. Dans cette partie, les cellules Huh7 ont été silencées pour MPV17 systématiquement avec un shMPV17 constitutivement exprimé.

#### 1. Investigation de la voie des SMADs

##### 1.1 TGF- $\beta$

L'analyse du RNA-Seq précédemment effectuée sur des cellules silencées pour MPV17 avec un shMPV17 constitutif (cellules shMPV17 Const) a montré que l'expression de TGF- $\beta$ 1 n'était que légèrement augmentée dans ces cellules comparées aux cellules transduites avec un shNT constitutif (cellules shNT Const), avec un  $\log_2$  fold change de 1,175 (p-value =  $3,84 \cdot 10^{-12}$ ). Cependant, un z-score positif élevé (z-score = 7,144 ; p-value =  $1.13 \cdot 10^{-20}$ ) est attribué à TGF- $\beta$ 1 d'après l'analyse du RNA-Seq par le programme IPA (**Figure 1**). Cela signifie qu'un nombre important de gènes cibles de TGF- $\beta$ 1 sont affectés dans les cellules silencées pour MPV17 et qu'une forte activation des voies associées au TGF- $\beta$ 1 est prédite. Ces données de RNA-Seq rendent TGF- $\beta$  et sa voie de transduction du signal intéressants à étudier pour expliquer le phénotype prolifératif lié à MPV17.

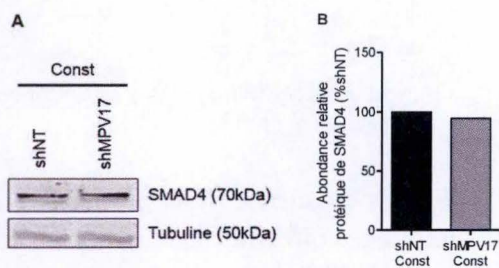
##### 1.2 Évaluation de l'abondance et de la localisation des SMADs

La lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire (CHC) Huh7, utilisée lors de ce mémoire, est connue pour être moins maligne et avoir une faible tendance à migrer, envahir et métastaser comparées à d'autres lignées cellulaires CHC telles que les cellules Mahlavu (Yang et al., 2009). Nous avons supposé dès lors que les cellules Huh7 pouvaient être représentatives des cellules cancéreuses au stade précoce de la tumorigenèse. Par conséquent, il paraît cohérent que les voies dépendantes de TGF- $\beta$  soient prédites par IPA comme étant activées dans des cellules Huh7 silencées pour MPV17, puisque celles-ci montrent une prolifération réduite.

La voie des SMADs est connue pour être la voie canonique de la transduction du signal de TGF- $\beta$ . En effet, les facteurs de transcription SMAD sont des médiateurs centraux de la transduction du signal de TGF- $\beta$  dans les cellules normales (Massague, 2012), mais également dans les CHC (Ji et al., 2006). De plus, ceux-ci ont été mis en évidence comme étant des cibles dans le réseau mécanistique du TGF- $\beta$  de l'analyse IPA. C'est pourquoi nous avons décidé d'investiguer cette voie qui pourrait potentiellement expliquer le phénotype prolifératif des cellules silencées pour MPV17 en évaluant l'abondance et l'activation de protéines SMADs.

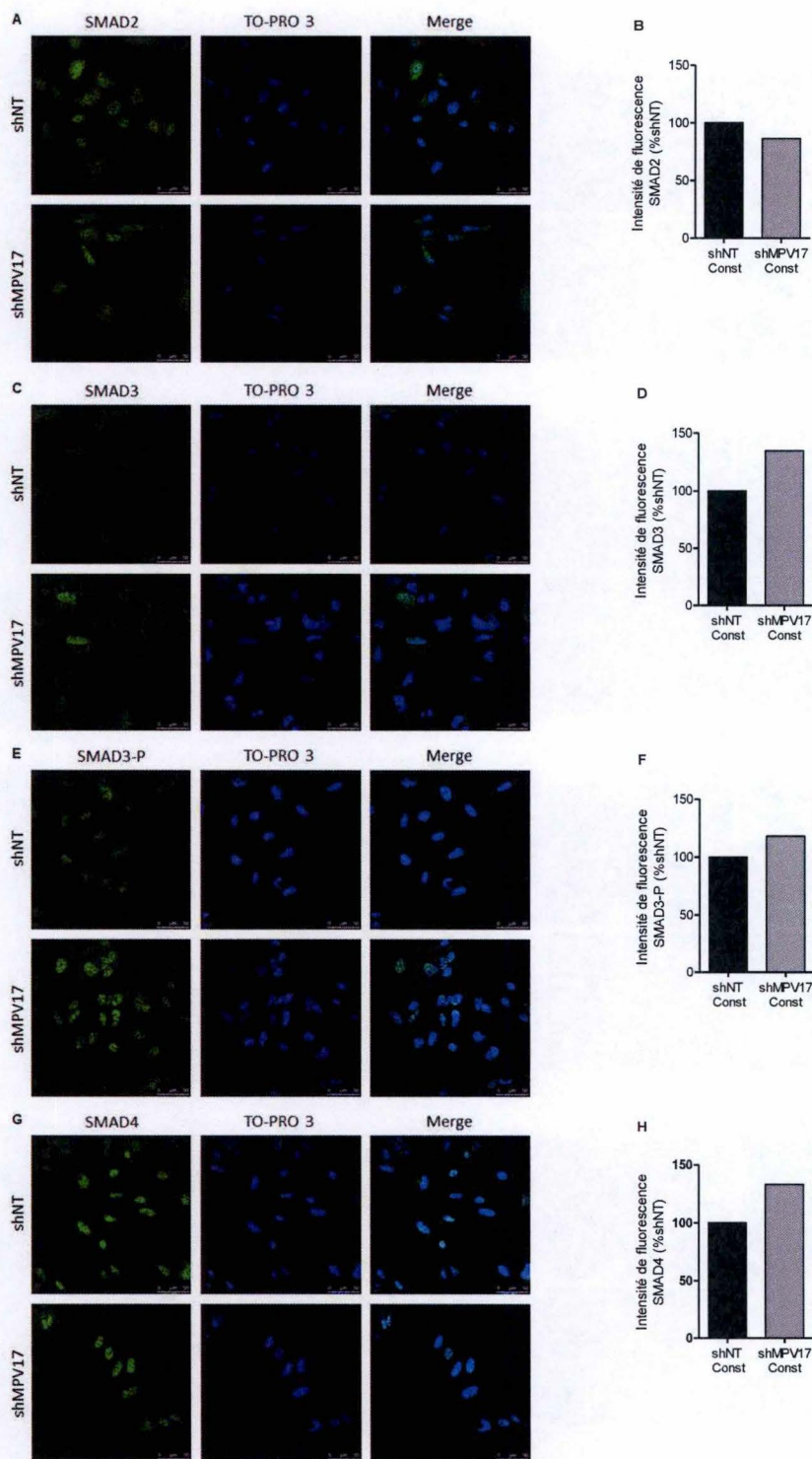
Plus précisément, nous nous sommes intéressés aux protéines SMADs régulées par les récepteurs 2 et 3 (SMAD2, SMAD3) qui sont des substrats des récepteurs TGF- $\beta$ . Nous nous sommes également concentrés sur la protéine SMAD co-stimulatrice 4 (SMAD4) capable de former des complexes avec SMAD2 et/ou SMAD3 et ainsi de les transporter vers le noyau où





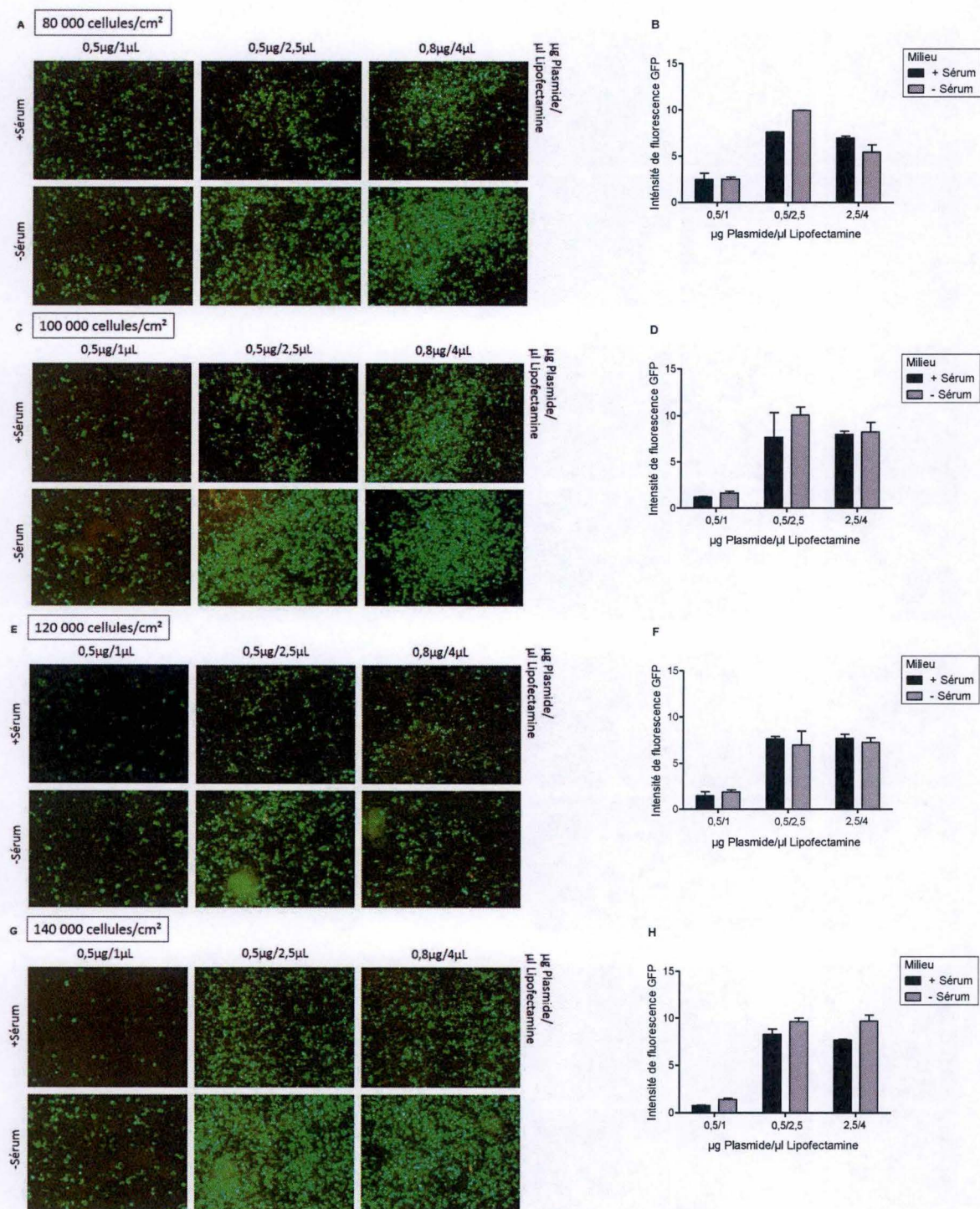
**Figure 2. Effet de la répression de MPV17 sur l'abondance de la protéine SMAD4.** Les cellules Huh7 ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). **(A)** L'abondance de SMAD4 a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Quantification de l'abondance de la protéine SMAD4 normalisée par l'abondance de la tubuline. L'expression de SMAD4 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules transduites avec un shNT Const.





**Figure 3. Effet de la répression de MPV17 sur l'abondance et la localisation subcellulaire de quatre membres de la famille des SMADs.** Analyse par immunofluorescence et observation en microscopie confocale des cellules Huh7 transduites avec un vecteur lentiviral shRNA constitutif ne ciblant aucune séquence (shNT) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17). Des anticorps monoclonaux contre SMAD2 (A), SMAD3 (C), SMAD3 phosphorylée (E) et SMAD4 (G) ont été utilisés pour marquer l'antigène correspondant par immunofluorescence (vert). Les noyaux ont été colorés en bleu avec du TO-PRO3. Une quantification du marquage par immunofluorescence des protéines SMAD2 (B), SMAD3 (D), SMAD3 phosphorylée (F) et SMAD4 (H), a été calculée sur la base de la différence d'intensité de fluorescence des protéines dans le noyau des cellules shMPV17 par rapport aux cellules shNT dans plus de 100 cellules par condition expérimentale, excepté pour SMAD2 (nombre de cellules  $\approx 60$ ), ( $n = 1$ ) en utilisant Image J.





**Figure 4. Optimisation de la transfection des cellules Huh7.** Les cellules Huh7 transduites avec un vecteur lentiviral shRNA constitutif ne ciblant aucune séquence (shNT) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17), ont été transfectées avec un plasmide exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP). Les cellules ont été ensemencées à une densité de 80 000, 100 000, 120 000 ou 140 000 cellules/cm<sup>2</sup> et transfectées avec 3 différents ratios de µg de plasmide par µl de Lipofectamine dans un milieu avec ou sans sérum. Analyse par microscopie à fluorescence de la capacité des cellules Huh7 à être transfectées en fonction de leur densité : 80 000 (A), 100 000 (C), 120 000 (E) ou 140 000 (G) cellules/cm<sup>2</sup>. Une estimation de l'efficacité de la transfection a été réalisée par analyse fluorimétrique des différentes conditions expérimentales : 80 000 (B), 100 000 (D), 120 000 (F) ou 140 000 (H) cellules/cm<sup>2</sup>.



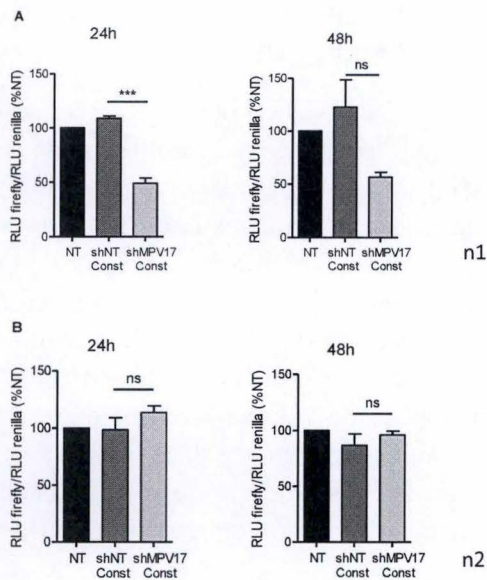
leur activité des facteurs de transcription peut avoir lieu. Une fois dans le noyau, ces complexes SMADs régulent l'activité des gènes cibles de TGF- $\beta$  (Shi and Massagué, 2003).

Nous avons d'abord étudié l'effet de la déplétion de MPV17 sur le niveau protéique de SMAD4 dans les cellules Huh7 silencées pour MPV17. Aucune différence dans l'abondance de la protéine SMAD4 n'a été observée dans les cellules shMPV17 Const par rapport aux cellules shNT Const (**Figure 2**). Cependant, ce sont les formes de localisation nucléaire de SMAD4 et des formes phosphorylées SMAD2/3 (SMAD2/3-P) qui sont associées à une activation de la signalisation du TGF- $\beta$ . Par conséquent, un marquage par immunofluorescence a été effectué pour déterminer l'abondance et la localisation nucléaire des protéines SMADs dans les cellules shMPV17 Const par rapport aux cellules shNT Const (**Figure 3A, C, E et G**). La quantification des signaux d'immunofluorescence suggère une augmentation de l'abondance nucléaire de SMAD3 (35%), SMAD3-P (18%) et SMAD4 (34%) mais aucune différence dans l'abondance nucléaire de SMAD2 (**Figure 3B, D, F et H**). Cependant, une localisation des protéines au niveau du noyau ne reflète pas forcément l'activité de ceux-ci, c'est pourquoi nous avons utilisé un gène rapporteur luciférase pour évaluer cette activité.

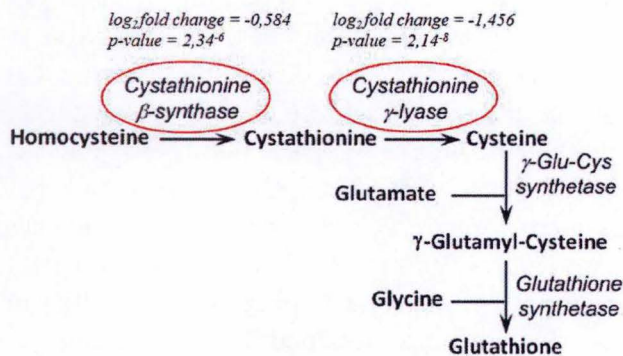
### 1.3 Optimisation de la transfection des cellules Huh7

L'utilisation du gène rapporteur implique que les cellules Huh7 doivent être transfectées avec un plasmide contenant ce gène. Les cellules Huh7 n'ayant pas encore été transfectées précédemment au laboratoire, une mise au point pour déterminer les conditions adéquates de transfection des cellules Huh7 a été effectuée. Trois critères ont été pris en compte : la densité à laquelle les cellules sont transfectées, le rapport entre la quantité de plasmide en  $\mu\text{g}$  et le volume d'agent transfectant en  $\mu\text{l}$  à utiliser et la présence ou l'absence de sérum dans un milieu de culture. Pour cette optimisation, les cellules ont été transfectées avec un plasmide contenant le gène de la Green Protein Fluorescent (GFP) placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif CMV. Ce rapporteur a été choisi sur base de la facilité avec laquelle il est possible de visualiser au microscope à fluorescence si les cellules expriment la GFP suite à la transfection. En se basant sur un article décrivant l'optimisation de la transfection des cellules Huh7 (Hashemi et al., 2012) et le protocole suggéré par le fournisseur de l'agent transfectant, nous avons décidé de tester des densités de 80 000 (**Figure 4A**), 100 000 (**Figure 4C**), 120 000 (**Figure 4E**) et 140 000 (**Figure 4G**) cellules par  $\text{cm}^2$  et des ratios de 0,5/1, 0,5/2,5 et 0,8/4  $\mu\text{g}$  de plasmide par  $\mu\text{l}$  d'agent transfectant. Comme le montrent les micrographies prises lors de la visualisation des cellules transfectées par microscopie à fluorescence, les cellules Huh7 sont particulièrement faciles à transfecter lorsqu'on utilise un ratio de 0,5/2,5 ou 0,8/4  $\mu\text{g}$  de plasmide par  $\mu\text{l}$  d'agent transfectant pour toutes les densités cellulaires. Afin de préciser les conditions permettant une transfection optimale, nous avons mesuré la fluorescence émise par la GFP dans les différentes conditions expérimentales. En comparant les résultats obtenus en fonction des densités, 80 000 (**Figure 4B**), 100 000 (**Figure 4D**), 120 000 (**Figure 4F**) et 140 000 (**Figure 4H**), nous avons choisi les conditions de transfection suivantes : 100 000 cellules/ $\text{cm}^2$  pour la densité, un rapport de 0,5 $\mu\text{g}$  de plasmide pour 2,5  $\mu\text{l}$  d'agent transfectant et une transfection des cellules dans un milieu de culture sans sérum.





**Figure 5. Évaluation de l'activité des SMADs en utilisant un gène rapporteur luciférase.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). Les cellules ont toutes été transfectées avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase *firefly* placé sous le contrôle d'un promoteur contenant quatre copies de SBE (Smad Binding Element). Elles ont également été transfectées avec un plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase *renilla*, mesurant une activité basale, afin de normaliser les résultats obtenus avec le gène rapporteur de la luciférase *firefly*. L'activité de la luciférase mise en présence de son substrat a été mesurée à l'aide d'un luminomètre 24h et 48h après la transfection. Le rapport des unités de lumière relative (RLU) de *firefly* sur *renilla* est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules NT. Les p values ont été obtenues en utilisant un t test non apparié ( $p < 0,05$ ) (ns, non significatif ; \*\*\*  $p < 0,01$ ) sur des triplicats techniques ( $n=2$ ).



**Figure 6. Modification de l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du glutathion dans des cellules Huh7 silencées pour MPV17.** Les analyses de séquençage de l'ARN ont déterminé que le niveau de transcrits de la cystathionine  $\beta$ -synthase et de la cystathionine  $\gamma$ -lyase sont diminués dans les cellules Huh7 silencées pour MPV17 comparées aux cellules shNT ( $\log_2$  fold change et p-value indiqués). Ces protéines sont impliquées dans la voie de synthèse du glutathion. Figure adaptée de Vitvitsky et al., 2007.



### 1.4 Evaluation de l'activité des SMADs dans les cellules Huh7 silencées pour MPV17

Pour déterminer l'activité des facteurs de transcription SMADs dans les cellules silencées pour MPV17, nous avons utilisé un plasmide contenant le gène rapporteur luciférase *firefly* sous le contrôle d'un promoteur contenant quatre copies de Smad Binding Element (SBE). En présence de luciférine, la quantité de lumière produite par la réaction entre la luciférase *firefly* et son substrat sera proportionnelle à l'activité du complexe Smad3/Smad4 (Zawel et al., 1998). Contre toute attente, nous avons observé lors d'une première transfection une diminution de 50% de l'activité des SMADs dans les cellules shPMPV17 Const après 24h puis 48h de transfection avec une différence significative à 24h (**Figure 5A**). Or, étant donné le z-score important attribué à TGF- $\beta$  par l'analyse IPA, nous nous serions attendu à observer une augmentation de l'activité de la voie canonique de celui-ci et donc des SMADs. Une seconde transfection a montré qu'aucune différence de l'activité des SMADs n'a été détectée par le gène rapporteur (**Figure 5B**). Basé sur ces deux transfections il est difficile de déterminer comment l'activité des SMADs est affectée dans les cellules silencées pour MPV17. Des réplicats supplémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer celle-ci.

## 2. Tentative de restauration du phénotype prolifératif

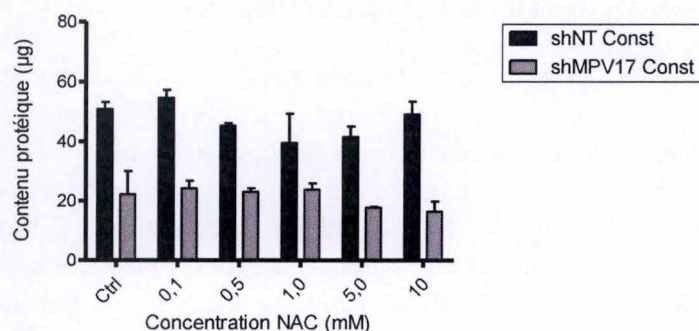
L'analyse du RNA-Seq a également prédit une inhibition de l'activité d'ATF4 dans les cellules Huh7 silencées pour MPV17 avec un  $\log_2$  fold change de -0,551 (p-value =  $1,02^{-6}$ ) comparées à des cellules transduites avec un shNT (**Figure 1**). Ici, nous étudions comment la régulation négative d'ATF4 pourrait être impliquée dans le phénotype de faible prolifération.

ATF4 est un candidat intéressant pour expliquer le phénotype prolifératif des cellules cancéreuses silencées pour MPV17. ATF4 est un régulateur bien connu de l'expression des gènes induits par le stress, y compris dans le contexte du stress oxydatif. Par conséquent, une étude a montré que les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) invalidés pour ATF4 présentaient une homéostasie redox altérée en raison d'une augmentation des taux de ROS et une diminution de la disponibilité du glutathion réduit (GSH), un antioxydant majeur (Harding et al., 2003).

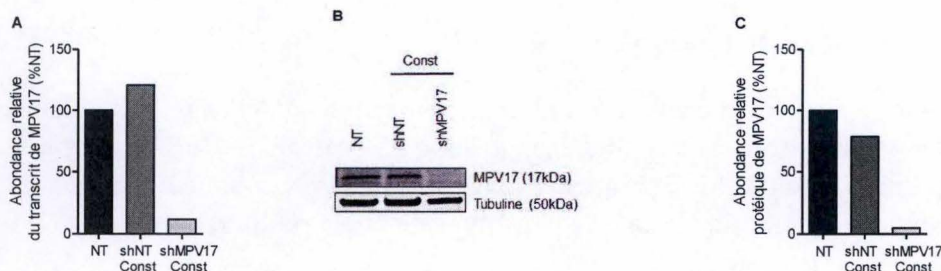
Une autre étude rapporte que le facteur de transcription C/EBP $\gamma$  est un partenaire obligatoire pour ATF4 dans la régulation de nombreux gènes liés aux réponses au stress. En réponse à l'induction de gènes activés en réponse à un stress, C/EBP $\gamma$  est capable de former un hétérodimère qui se lie à des promoteurs de gènes cibles (Huggins et al., 2015). L'étude a également montré que les MEFs C/EBP $\gamma^{-/-}$  présentent une capacité de prolifération plus faible en raison d'une diminution de l'apport en glutathion, ce qui entraîne un stress oxydatif. Une simple supplémentation en N-acétylcystéine (NAC) a permis de restaurer un phénotype prolifératif normal dans les MEFs C/EBP $\gamma^{-/-}$ , grâce à sa propriété antioxydante (Huggins et al., 2015).

Une analyse des données de RNA-Seq des cellules silencées pour MPV17 centrée sur les gènes codant pour les protéines impliquées dans la biosynthèse du glutathion (Lu, 2009) indique que certains d'entre eux ont des niveaux de transcrits réduits. Ces gènes sont CBS, codant pour la cystathionine  $\beta$ -synthase ( $\log_2$  fold change = -0,584 ; p-value =  $2,34^{-6}$ ) et CTH pour la cystathionine  $\gamma$ -lyase ( $\log_2$  fold change = -1,456 ; p-value =  $2,14^{-8}$ ) (**Figure 6**). Cette observation





**Figure 7. Supplémentation en N-acétylcystéine.** Les cellules Huh7 ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). Les cellules ont étéensemencées à la même densité, avant d'être incubées pendant 4 jours avec les concentrations de N-acétylcystéine (NAC) indiquées. La teneur totale en protéines a ensuite été évaluée par dosage protéique de Folin. SD calculé à partir de triplicats techniques ( $n = 1$ ). Le contrôle (Ctrl) représenté sur le graphe est la condition où les cellules transduites avec shNT Const ne sont pas traitées avec du NAC.



**Figure 8. Évaluation du niveau de répression du gène MPV17 dans des cellules Huh7 exprimant constitutivement un shRNA ciblant MPV17.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). (A) La répression de MPV17 au niveau du transcript a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. (B) La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (C) Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la protéine tubuline. L'abondance relative de MPV17 au niveau transcript (A) et protéique (B et C) est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non transduites (NT) ( $n=1$ ).



a conduit à l'hypothèse qu'une pénurie de précurseurs pour la biosynthèse du glutathion pourrait causer un stress oxydatif et expliquer le phénotype prolifératif de MPV17. Sur base de ces données, conjointement avec la régulation négative d'ATF4 dans les cellules silencées pour MPV17, nous avons tenté de restaurer la prolifération des cellules shMPV17 Const en utilisant la supplémentation en NAC, telle qu'elle est décrite dans l'article de Huggins *et al.* Cependant, la supplémentation en NAC n'a pas permis de rétablir la prolifération cellulaire des cellules silencées pour MPV17 (**Figure 7**).

### Partie II : Construction d'une lignée cellulaire silencée pour MPV17 de manière inductible

#### **1. Efficacité du silençage de MPV17 en utilisant un shRNA constitutif**

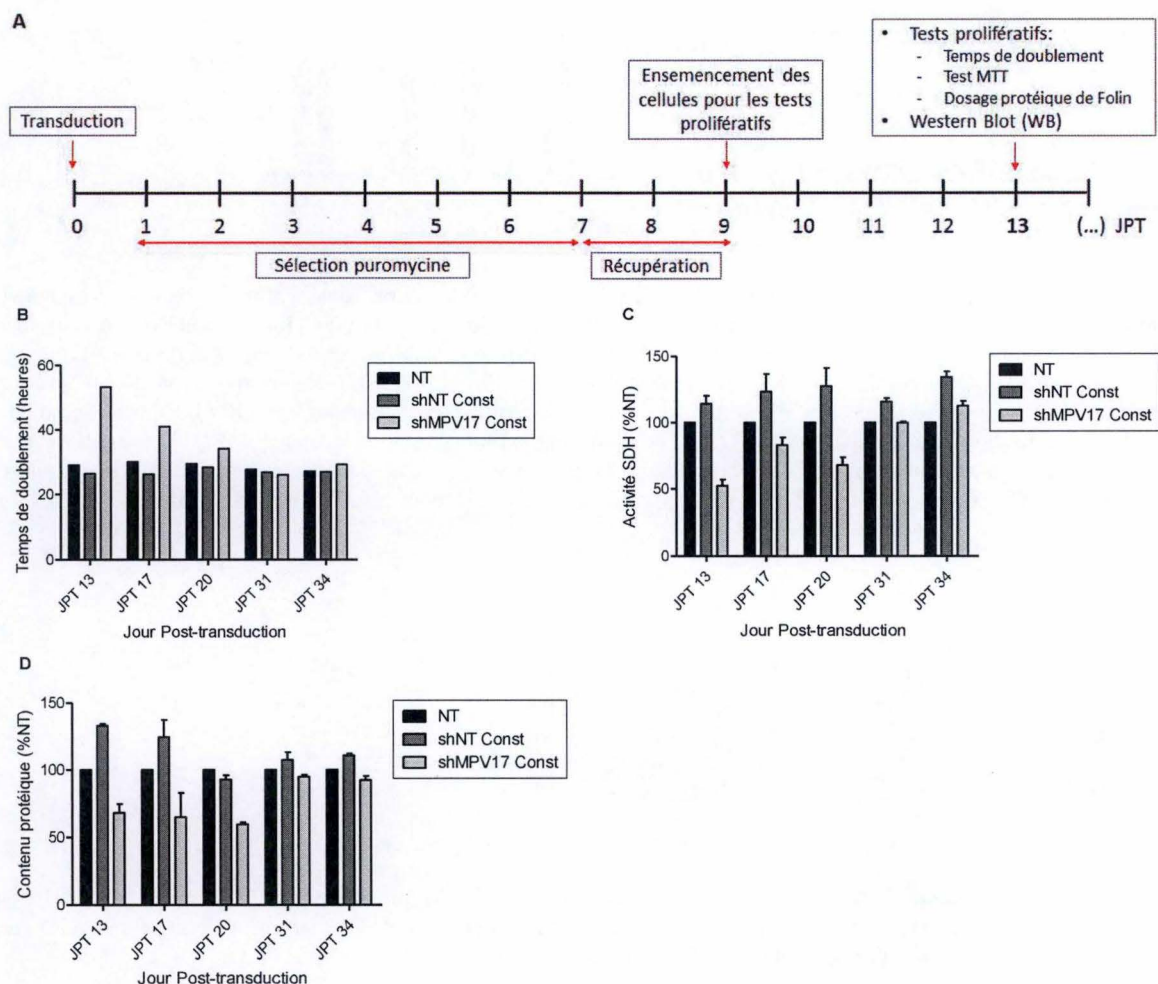
L'interférence par ARN est un outil puissant utilisé comme technique de silençage de gènes. Ce système est basé sur l'utilisation de courtes séquences d'ARN non codantes (ARNnc) capable de s'hybrider à un ARNm, permettant d'inhiber son expression soit par la dégradation de l'ARNm cible ou par l'arrêt du processus de traduction de celui-ci en protéine. Cette approche est particulièrement utilisée lors d'études centrées sur des protéines dont la fonction est mal connue. En effet, étudier le phénotype induit par le silençage d'un gène permet de comprendre à quel processus biologique la protéine codée par ce gène participe. L'introduction d'une courte séquence d'ARN en forme d'épingle à cheveux (short hairpin RNA, shRNA) par transduction lentivirale est l'approche utilisée dans notre laboratoire pour silencer l'expression du gène MPV17 dans différentes lignées cellulaires. Le gène codant pour le shRNA a été inséré dans le génome viral (voir Matériel et Méthodes). Suite à la transduction, le génome viral est rétrotranscrit puis intégré dans le génome de la cellule hôte. Le transgène codant le shRNA peut donc être constitutivement exprimé de façon permanente et stable.

Ainsi, lorsque les cellules sont transduites avec un vecteur contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const), une répression du gène MPV17 est observée au niveau du transcrit (**Figure 8A**) et au niveau protéique (**Figure 8B et C**) dans les cellules silencées pour MPV17 comparées aux contrôles, c'est-à-dire les cellules non transduites (NT).

#### **2. Mise en évidence de la perte progressive du phénotype de faible prolifération avec un shMPV17 constitutif**

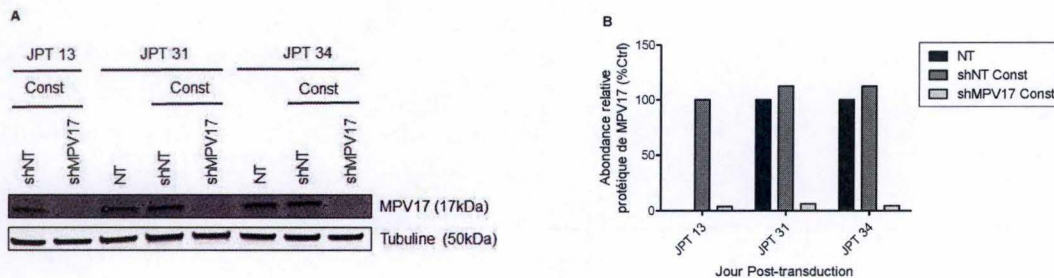
Le phénotype observé lors du silençage de MPV17 dans les cellules cancéreuses Huh7, ainsi que dans trois autres lignées cancéreuses, est une réduction de près de 60% de la capacité proliférative de ces cellules comparée à des cellules cancéreuses dont l'expression de MPV17 est intacte (**Figure 6, Introduction**). L'observation de ce phénotype, ainsi que d'autres précédentes découvertes, a amené à émettre l'hypothèse que MPV17 serait impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant, nous avons observé une perte progressive du phénotype prolifératif étudié dans les cellules silencées pour MPV17 suite à l'utilisation d'un shMPV17 constitutivement exprimé (cellules shMPV17 Const), au cours des jours post-transduction. En effet, les trois tests complémentaires utilisés pour évaluer le taux de prolifération des cellules, montrent qu'au 13<sup>e</sup> jour post-transduction (JPT13) les cellules shMPV17 Const ont une capacité proliférative deux fois moindre comparé aux cellules



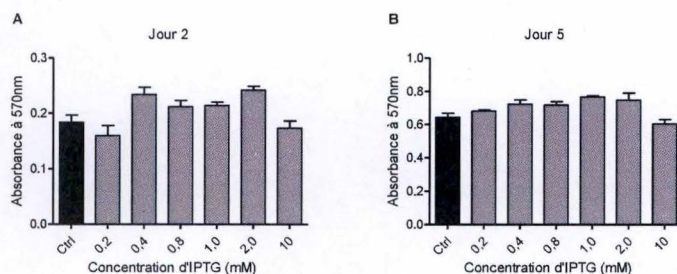


**Figure 9. Perte du phénotype de faible prolifération au fil des jours post-transduction lors de l'utilisation de shMPV17 constitutif.** (A) Schéma expérimental : les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const) avec une multiplicité d'infection (MOI) de 25. Après 24 heures d'incubation avec les particules lentivirales, les cellules transduites ont été traitées avec 2,5µg/mL de puromycine pendant 6 jours pour sélectionner les cellules contenant un shNT ou un shMPV17, grâce à leur capacité de résistance à la puromycine. Au cours des jours post-transduction (JPT), la capacité proliférative des cellules a été évaluée, 4 jours après ensemencement à la même densité, à l'aide de trois différents tests : (B) Le temps de doublement, (C) l'activité succinate déshydrogénase (test MTT) (D) et le dosage protéique de Folin. SD calculé à partir de triplicats techniques (n = 1).





**Figure 10. Évolution de l'abondance protéique de MPV17 dans des cellules Huh7 exprimant constitutivement un shMPV17 au fil du temps post-transduction.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). **(A)** La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot au cours des jours post-transduction (JPT). La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la protéine tubuline. L'abondance protéique de MPV17 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules shNT Const pour le JPT13 et par rapport aux cellules NT pour les JPT31 et 34 (Ctrl) n=1.



**Figure 11. Évaluation de la toxicité de l'IPTG.** Les cellules Huh7 non-transduites ont été incubées pendant **(A)** 2 jours ou **(B)** 5 jours avec les différentes concentrations d'IPTG indiquées. La viabilité cellulaire a ensuite été évaluée par un test MTT. SD calculé à partir de triplicats techniques (n = 1).



contrôles. Cependant, à partir du JPT31, les cellules shMPV17 Const récupèrent une capacité proliférative similaire aux cellules contrôles (**Figure 9**). Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer cette observation. La première est qu'il existerait une diminution de l'expression du shRNA. La seconde est que les cellules shMPV17 Const serait capable de mettre en place des stratégies d'adaptation au silençage de MPV17. Afin de tester la première hypothèse, nous avons examiné le niveau protéique de MPV17 à différents jours post-transduction. Ainsi nous avons montré que cette perte de phénotype est observée bien que l'abondance de la protéine MPV17 soit toujours diminuée au cours des jours post-transduction dans les cellules shMPV17 Const (**Figure 10**), suggérant que la perte du phénotype n'est pas due à une restauration de l'expression de la protéine MPV17.

### 3. Développement d'une lignée cellulaire Huh7 au silençage de MPV17 inducible

Nous avons donc voulu développer une version inducible du transgène shMPV17 pour remplacer l'utilisation d'une expression constitutive du transgène, afin d'éviter l'adaptation des cellules au silençage de MPV17. La répression de MPV17 pourra être ajustable grâce à la transduction d'un plasmide contenant un shMPV17 dont l'expression est inducible par un agent inducteur, l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). En effet l'IPTG, un analogue du lactose, est capable de contrôler le répresseur (LacI) de l'expression du shMPV17. La présence de l'IPTG empêche le répresseur de venir se lier sur l'opérateur (LacO) et permet l'expression de celui-ci. Cette libération aboutit à l'activation du promoteur qui permet l'expression du shMPV17 dans les cellules Huh7 transduites avec la construction inducible et ayant été traitées avec de l'IPTG (**Figure 2, Matériel et Méthodes**). De cette manière, la répression de MPV17 est induite uniquement lorsque cela est nécessaire tout en évitant de donner le temps aux cellules de s'adapter au silençage de MPV17.

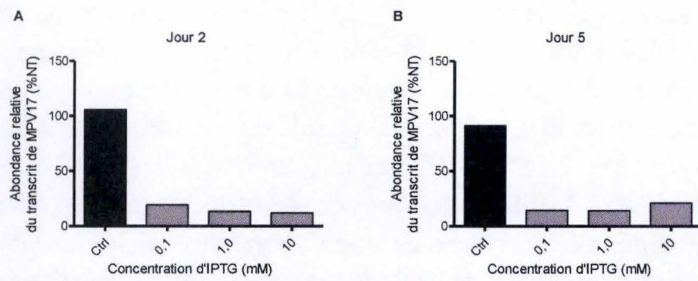
#### 3.1 Évaluation de la toxicité de l'IPTG

La première étape fut d'évaluer la toxicité potentielle de l'IPTG sur les cellules Huh7 NT. Celles-ci ont été incubées avec une gamme de concentrations allant jusqu'à 10 mM d'IPTG pendant 2 à 5 jours. Nous n'avons pas observé de différence significative dans la viabilité des cellules Huh7 NT incubées avec des concentrations croissantes d'IPTG, comparées aux cellules Huh7 non traitées (**Figure 11**).

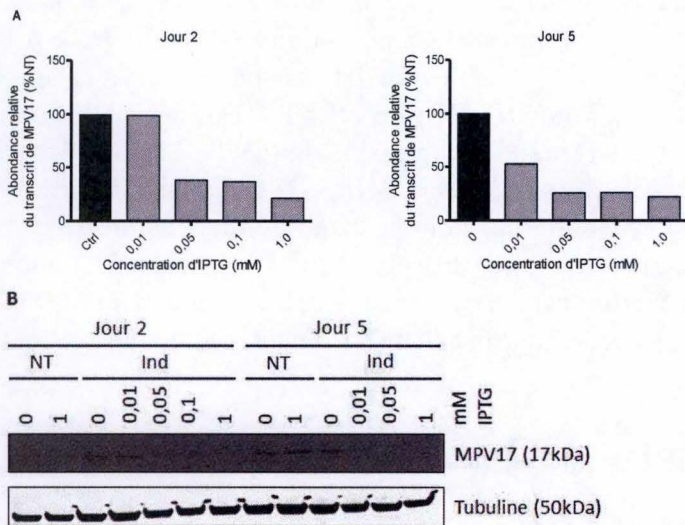
#### 3.2 Évaluation de l'efficacité de l'IPTG

Comme l'IPTG ne semble pas toxique pour les cellules Huh7, nous avons recherché la concentration d'IPTG capable de diminuer l'expression de MPV17 et d'obtenir un phénotype prolifératif similaire à celui observé lorsque les cellules Huh7 sont transduites avec un shMPV17 constitutif. Dans la littérature, l'induction de shRNA dépendante de l'IPTG peut être obtenue avec des concentrations allant de 250 pM à 5 mM avec une incubation des cellules en présence de l'IPTG pendant 2 à 5 jours (Deans et al., 2007 ; Wu et al., 2007). Pour optimiser la concentration d'IPTG et le temps nécessaire d'incubation pour une diminution efficace de l'expression de la protéine MPV17, les cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 à expression inducible (cellules shMPV17 Ind) et les cellules Huh7 NT ont étéensemencées dans un milieu contenant des concentrations croissantes d'IPTG.





**Figure 12. Effet d'une large gamme de concentrations en IPTG sur la répression de MPV17 dans des cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 à expression inducible.** Les cellules Huh7 ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par l'IPTG (shMPV17 Ind). Les cellules ont été incubées pendant (A) 2 jours ou (B) 5 jours avec les concentrations en IPTG indiquées. La répression de MPV17 au niveau du transcript a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. L'expression de MPV17 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG. Le contrôle (Ctrl) représenté sur le graphe est la condition où les cellules transduites avec un shMPV17 Ind ne sont pas traitées avec de l'IPTG (n=1).



**Figure 13. Effet d'une gamme étroite de concentrations en IPTG sur la répression de MPV17 dans des cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 à expression inducible.** Les cellules Huh7 ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par l'IPTG (shMPV17 Ind). Les cellules ont été incubées pendant 2 jours ou 5 jours avec les concentrations en IPTG indiquées. (A) La répression de MPV17 au niveau du transcript a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. (B) La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. L'abondance relative de MPV17 au niveau du transcript (A) et de la protéine (B) est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG. Le contrôle (Ctrl) représenté sur le graphe est la condition où les cellules transduites avec shMPV17 Ind ne sont pas traitées avec de l'IPTG (n=1).



Dans un premier temps, une large gamme de concentrations en IPTG a été testée (0 - 0,1 - 1 - 10 mM) durant 2 et 5 jours afin de déterminer la concentration en IPTG nécessaire à la diminution de l'expression de MPV17. L'abondance de MPV17 au niveau du transcrit a été évaluée par RT-qPCR. Nous avons observé une diminution de l'expression de MPV17 de l'ordre de 85% pour toutes les concentrations testées, comparées aux cellules Huh7 non traitées, après 2 (**Figure 12A**) et 5 jours (**Figure 12B**). Ces données indiquent qu'une concentration d'IPTG aussi faible que 0,1 mM est suffisante pour induire l'expression du shRNA et provoquer une diminution de l'expression de MPV17 à un niveau comparable à celui obtenu avec le shMPV17 constitutif précédemment utilisé au laboratoire, avec lequel la diminution de l'expression de MPV17 atteignait 90% (**Figure 8**).

Une gamme de concentration plus étroite en IPTG a été testée (0 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 1 mM) afin de définir une concentration en IPTG permettant d'obtenir une diminution de l'expression de MPV17 similaire à celle obtenue en utilisant un shMPV17 constitutif, tout en évitant d'éventuels effets secondaires de l'IPTG. L'expression de MPV17 des cellules shMPV17 Ind incubées avec les différentes concentrations d'IPTG a été évaluée au niveau du transcrit par RT-qPCR (**Figure 13A**) et au niveau protéique par Western Blot (**Figure 13B**) après 2 ou 5 jours d'incubation. Ainsi, nous avons pu observer que la concentration de 0,01 mM d'IPTG ne permettait pas une diminution de l'expression de MPV17 au niveau protéique même après 5 jours en présence d'IPTG malgré une diminution de l'expression de MPV17 de 50% au niveau du transcrit au 5<sup>e</sup> jour d'incubation (**Figure 13A**). Cette concentration est donc à exclure pour la suite du travail. Pour les trois autres concentrations, malgré que les Western Blots ne soient pas de bonne qualité, on peut tout de même observer qu'une concentration d'IPTG aussi faible que 0,05 mM est suffisante pour induire une répression de MPV17.

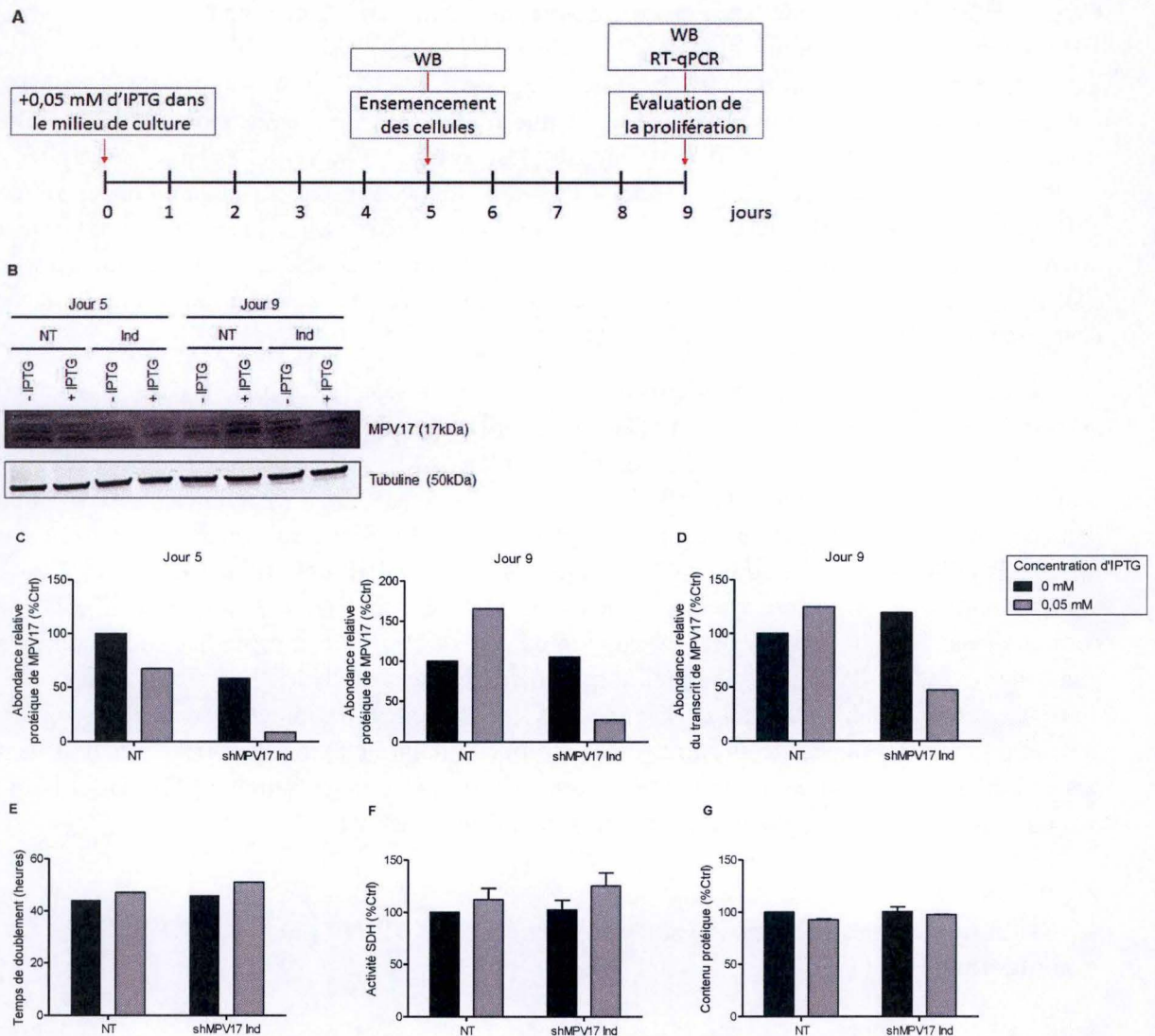
#### **4. Évaluation de la prolifération suite au silençage de MPV17 par un shMPV17 inducible**

Nous avons donc obtenu à ce stade des résultats préliminaires sur la capacité de différentes concentrations d'IPTG à induire la diminution de l'expression de MPV17. Sur base de ces résultats, nous avons sélectionné la concentration de 0,05 mM en IPTG pour évaluer le phénotype prolifératif des cellules silencées pour MPV17 par un shMPV17 inducible. Ces cellules ont été systématiquement comparées à des cellules transduites avec le même shMPV17 inducible mais non traitées à l'IPTG et à des cellules NT traitées ou non à l'IPTG, qui représentent les trois conditions contrôles.

##### **4.1 Utilisation d'une concentration de 0,05 mM d'IPTG pour induire le silençage de MPV17**

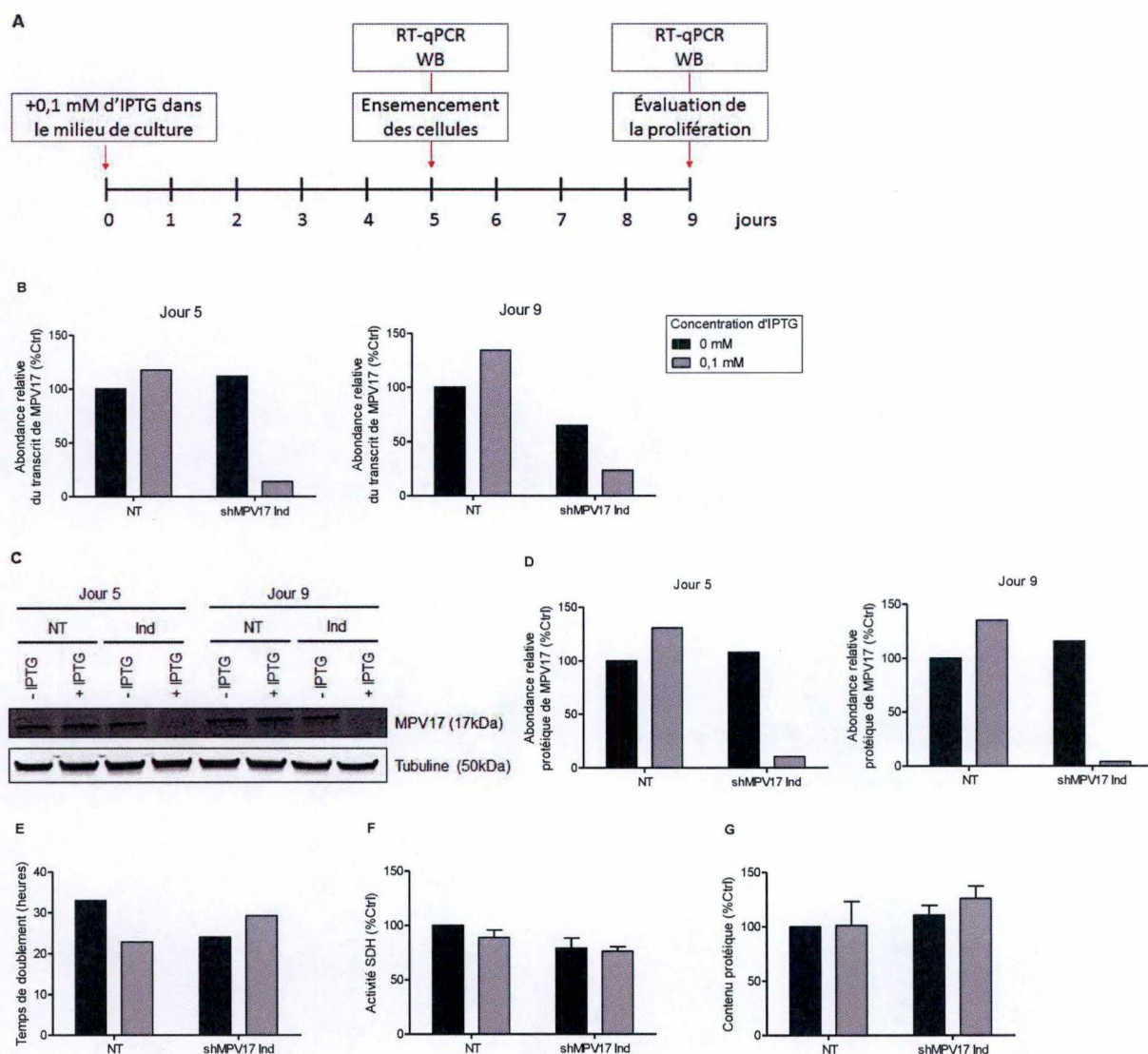
Dans un premier temps, la concentration de 0,05 mM d'IPTG a été choisie car estimée comme étant la concentration permettant une diminution suffisante de l'expression de MPV17 tout en utilisant la plus petite concentration d'IPTG possible. Les cellules ont été incubées avec de l'IPTG pendant 5 jours pour s'assurer d'une diminution efficace de l'expression de MPV17. Après ces 5 jours d'incubation (J5), les cellules ont étéensemencées à la même densité et traitées ou non avec de l'IPTG pendant 4 jours supplémentaires. Au bout de ces 4 jours (J9), la prolifération cellulaire a été évaluée (**Figure 14A**).





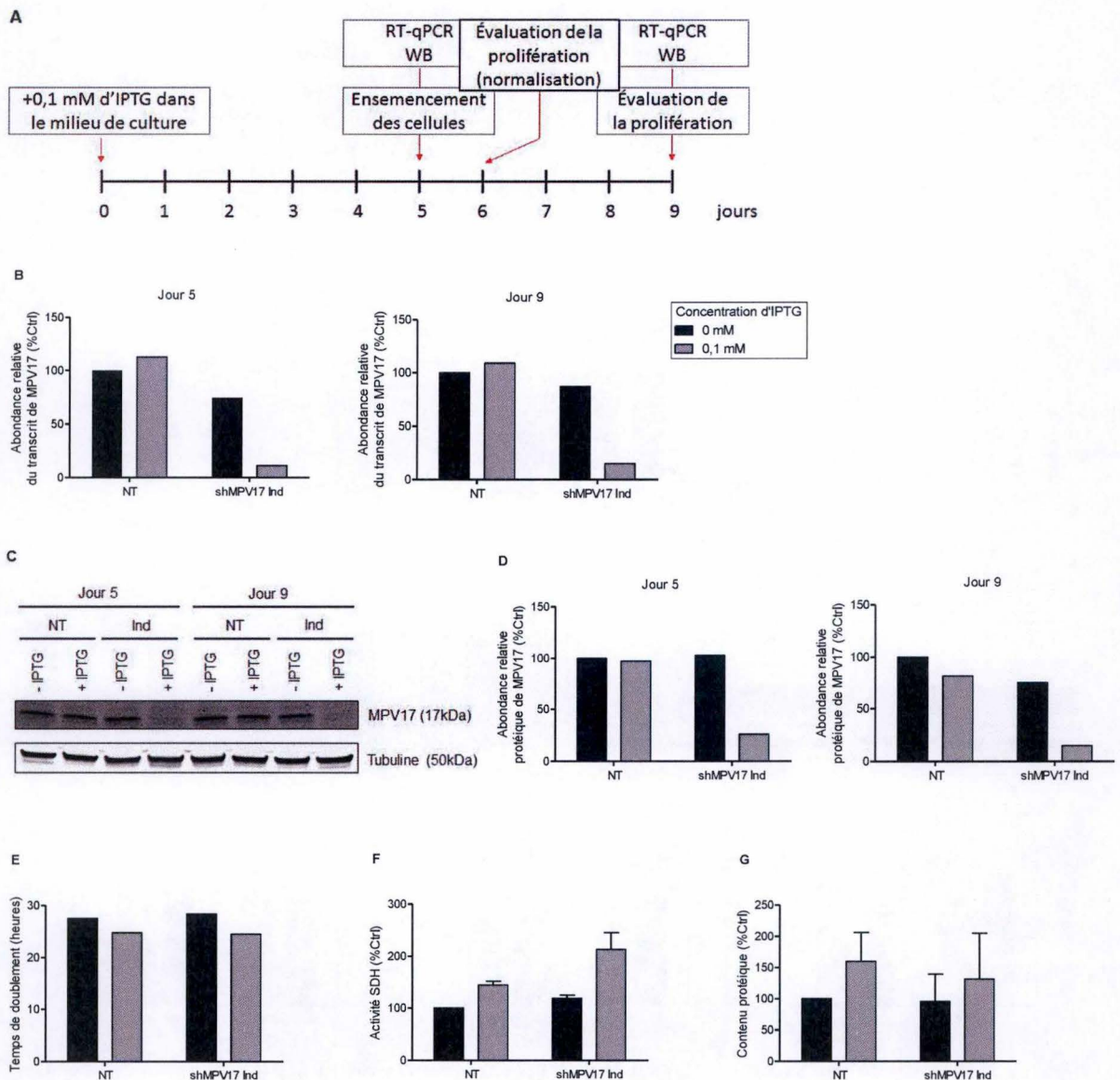
**Figure 14. Effet d'une concentration de 0,05 mM d'IPTG sur la répression de MPV17 dans des cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 à expression inducible.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par de l'IPTG (shMPV17 Ind). (A) Les cellules ont été incubées pendant 5 à 9 jours avec 0,05 mM d'IPTG. (B) La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (C) Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la protéine tubuline. (D) La répression de MPV17 au niveau du transcript a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. L'abondance relative de MPV17 au niveau du transcript (B) et de la protéine (C et D) est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). **Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 à expression inducible sur la prolifération des cellules Huh7 transduites.** (A) Les cellules ont été incubées pendant 9 jours avec 0,05 mM d'IPTG. La prolifération cellulaire a été évaluée, 4 jours après l'incubation de 5 jours en présence d'IPTG, à l'aide de trois différents tests : (E) Le temps de doublement, (F) l'activité succinate déshydrogénase (test MTT) (G) et le dosage protéique de Folin. Tous les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). SD calculé à partir de triplicats techniques (n = 1).





**Figure 15. Effet d'une concentration de 0,1 mM d'IPTG sur la répression de MPV17 dans des cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 à expression inducible.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par de l'IPTG (shMPV17 Ind). (A) Schéma expérimental : les cellules ont été incubées pendant 5 à 9 jours avec 0,1 mM d'IPTG. (B) La répression de MPV17 au niveau du transcrite a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. (C) La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (D) Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la protéine tubuline. L'abondance relative de MPV17 au niveau du transcrite (B) et de la protéine (C et D) est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). **Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 à expression inducible sur la prolifération des cellules Huh7 transduites.** (A) Les cellules ont été incubées pendant 9 jours avec 0,1 mM d'IPTG. La capacité proliférative des cellules a été évaluée, 4 jours après l'incubation de 5 jours en présence d'IPTG, à l'aide de trois différents tests : (E) Le temps de doublement, (F) l'activité succinate déshydrogénase (test MTT) (G) et le dosage protéique de Folin. Tous les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). SD calculé à partir de triplicats techniques (n = 1).





**Figure 16. Effet d'une concentration de 0,1 mM d'IPTG sur la répression de MPV17 dans des cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 à expression inducible.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par de l'IPTG (shMPV17 Ind). **(A)** Schéma expérimental : les cellules ont été incubées pendant 5 à 9 jours avec 0,1 mM d'IPTG. **(B)** La répression de MPV17 au niveau du transcrite a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. **(C)** La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **(D)** Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la tubuline. L'abondance relative de MPV17 au niveau du transcrite **(B)** et de la protéine **(C et D)** est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). **Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 à expression inducible sur la prolifération des cellules Huh7 transduites.** **(A)** Les cellules ont été incubées pendant 9 jours avec 0,1 mM d'IPTG. La capacité proliférative des cellules a été évaluée, 1 (J6) puis 4 jours (J9) après l'incubation de 5 jours en présence d'IPTG, à l'aide de trois différents tests : **(A)** Le temps de doublement, **(B)** l'activité succinate déshydrogénase (test MTT) **(C)** et le dosage protéique de Folin. Tous les résultats ont été normalisés avec ceux obtenus au J6 et exprimés en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). SD calculé à partir de triplicats techniques (n = 1).



Malgré la mauvaise qualité du Western Blot, nous pouvons distinguer une diminution de l'expression de MPV17 au niveau protéique (**Figure 14B, C**) et une diminution de l'expression de MPV17 de seulement 50% au niveau du transcrit (**Figure 14D**). Cependant, aucun des trois tests utilisés pour évaluer la prolifération des cellules n'a indiqué de différence de capacité proliférative entre les cellules silencées pour MPV17 (shMPV17 Ind traitées avec 0,05 mM d'IPTG), comparées aux cellules shMPV17 Ind non traitées et aux cellules NT traitées ou non avec la même concentration d'IPTG (**Figure 14E, F et G**).

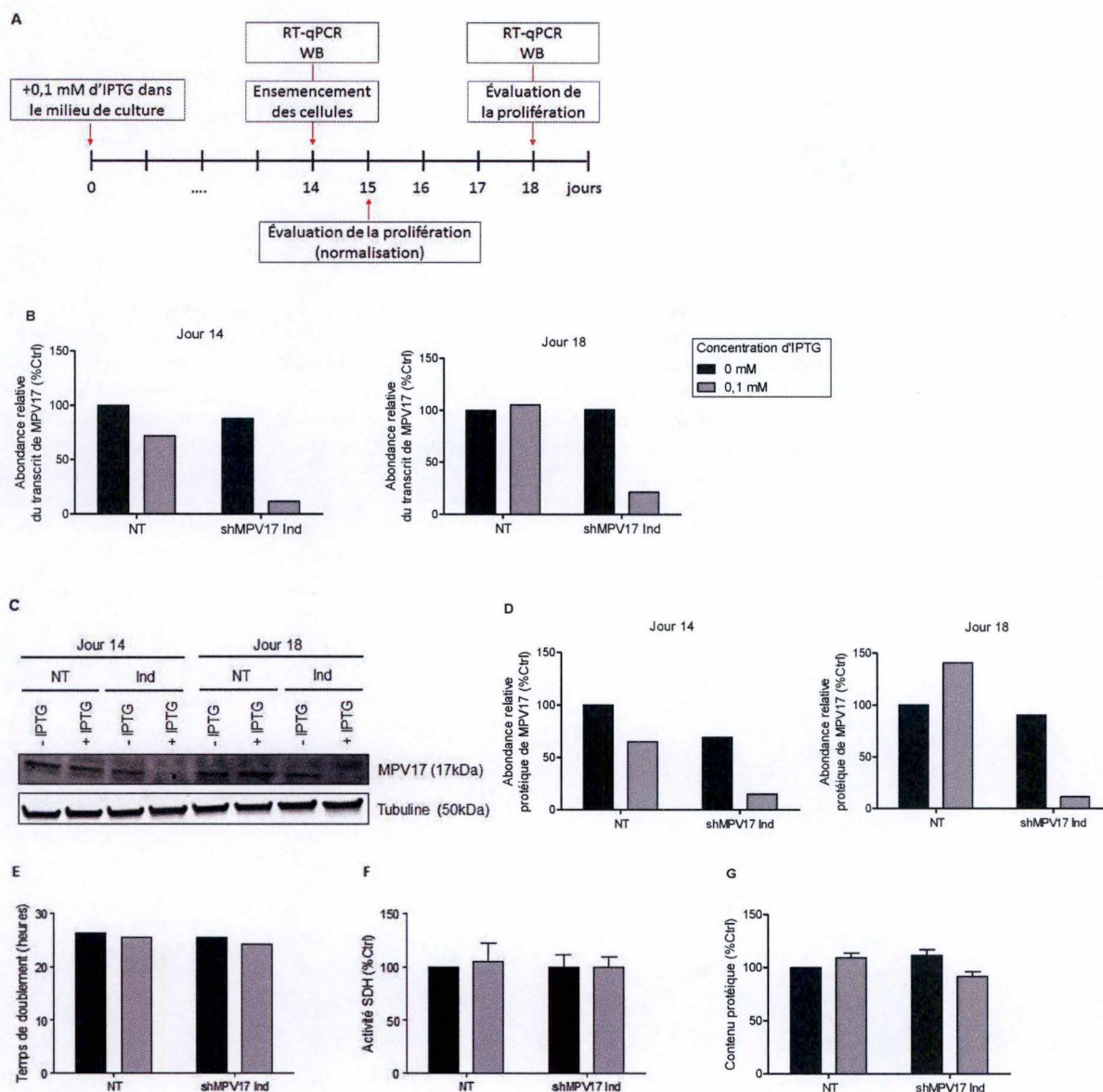
### 4.2 Utilisation d'une concentration de 0,1 mM d'IPTG pour induire le silençage de MPV17

Au vu des résultats précédents, la concentration de 0,05 mM d'IPTG semble insuffisante pour un silençage efficace de MPV17 permettant d'induire un phénotype prolifératif similaire à celui initialement observé dans les cellules dont le silençage de MPV17 a été possible à l'aide de shMPV17 constitutif (cellules shMPV17 Const) (**Figure 6, Introduction**). C'est pourquoi nous avons voulu tester une concentration en IPTG deux fois plus élevée, soit 0,1 mM d'IPTG.

Les cellules ont été traitées suivant le même schéma que lorsqu'elles étaient traitées avec 0,05 mM d'IPTG (**Figure 15A**). L'expression de MPV17 au niveau du transcrit et de la protéine a été évaluée après 5 jours (J5) puis 9 jours (J9) d'incubation avec l'IPTG. Une diminution de près de 90% de l'expression de MPV17 au niveau du transcrit (**Figure 15B**) et de 90% au J5 puis jusqu'à 95% au J9 au niveau protéique (**Figure 15C, D**) a été observée. Cette répression de MPV17 avec un shMPV17 inductible est celle se rapprochant le plus des résultats obtenus avec un shMPV17 constitutif (**Figure 8A, B**). Cependant, aucun des trois tests utilisés pour évaluer la prolifération des cellules n'a montré de différence entre les cellules silencées pour MPV17 (shMPV Ind traitées avec 0,1 mM d'IPTG), comparées aux cellules contrôles (**Figure 15E, F et G**).

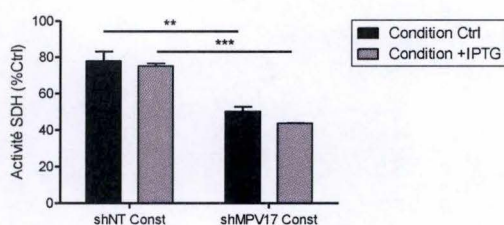
Cette répression de MPV17 étant équivalente à celle observée lors de l'étude du phénotype prolifératif des cellules shMPV17 Const, une répression insuffisante n'explique pas l'absence du phénotype montrée ici. Pour éliminer une éventuelle erreur provenant d'un ensemencement légèrement différent entre les cellules transduites et non transduites, nous avons répété l'expérience en ajoutant une mesure au jour 6 (J6) afin de normaliser les résultats obtenus lors des tests prolifératifs réalisés au J9 avec ceux du J6 (**Figure 16A**). Ainsi, les cellules transduites ont été incubées 5 jours avec 0,1 mM d'IPTG pour assurer une répression correcte de MPV17. Après ces 5 jours, les cellules ont étéensemencées à la même densité pour 4 jours supplémentaires d'incubation avec ou sans l'IPTG, selon les conditions (**Figure 16A**). L'expression de MPV17 au niveau du transcrit et au niveau protéique ont également été évaluée après 5 puis 9 jours de traitement. Finalement, les trois tests prolifératifs ont été réalisés un jour après l'ensemencement à la même densité puis après 4 jours. Ces tests réalisés au J6 servent à normaliser les résultats obtenus au J9 pour éliminer un éventuel biais provenant d'une erreur d'ensemencement. Nous avons observé une répression de MPV17 au niveau du transcrit similaire (**Figure 16B**) et une répression de MPV17 au niveau protéique légèrement inférieure (**Figure 16C et D**) à celle observée précédemment avec la même concentration d'IPTG (**Figure 9**). Malgré la normalisation des tests prolifératifs, aucune perte de la capacité proliférative des cellules silencées pour MPV17 comparée aux cellules contrôles n'a été observée pour les trois tests (**Figure 16E, F et G**).





**Figure 17. Effet d'une concentration de 0,1 mM d'IPTG sur la répression de MPV17 dans des cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 à expression inducible.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par de l'IPTG (shMPV17 Ind). (A) Schéma expérimental : les cellules ont été incubées pendant 2 semaines et 1 ou 4 jours avec 0,1 mM d'IPTG. (B) La répression de MPV17 au niveau du transcrit a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. (C) La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (D) Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la tubuline. L'abondance relative de MPV17 au niveau du transcrit (B) et de la protéine (C et D) est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). **Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 à expression inducible sur la prolifération des cellules Huh7 transduites.** (A) Les cellules ont été incubées pendant 2 semaines avec 0,1 mM d'IPTG. La capacité proliférative des cellules a été évaluée, 1 (J6) puis 4 jours (J9) après l'incubation de 5 jours en présence d'IPTG, à l'aide de trois différents tests : (E) Le temps de doublement, (F) l'activité succinate déshydrogénase (test MTT) (G) et le dosage protéique de Folin. Tous les résultats obtenus au J9 ont été normalisés avec ceux obtenus au J6 et exprimés en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). SD calculé à partir de triplicats techniques (n = 1).





**Figure 18. Effet des conditions d'IPTG sur les cellules réprimées pour MPV17 par un shMPV17 constitutif.** Les cellules Huh7 ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). Les cellules ont été incubées pendant 4 jours sans (Condition Ctrl) ou avec 0,1 mM d'IPTG (Condition +IPTG) et leur milieu a été changé tous les jours. La capacité proliférative des cellules a été évaluée par un test MTT. Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl). Les p values ont été obtenues en utilisant un t test non apparié (\*\* ;  $p < 0,01$ , \*\*\* ;  $p < 0,0001$ ) montrant une différence significative entre les shMPV17 Const et les shNT Const, pour les deux conditions. SD calculé à partir de triplicats techniques ( $n = 1$ ).



Une seconde hypothèse pour expliquer pourquoi le phénotype de faible prolifération n'a pas été observé dans les cellules shMPV17 Ind repose sur le nombre insuffisant de jours laissés entre la répression de MPV17 et l'étude du phénotype prolifératif. En effet, lorsque les cellules sont transduites avec un shMPV17 constitutif, les tests prolifératifs ne sont réalisés qu'après 2 semaines de répression. En se basant sur l'idée que les cellules transduites avec un shMPV17 inducible pourraient ne pas avoir suffisamment de temps en 5 jours pour initier des mécanismes antiprolifératifs menant à un phénotype observable, nous avons incubé les cellules transduites pendant deux semaines (J14) avec de l'IPTG avant de les ensemercer à la même densité pour 4 jours supplémentaires de traitement au terme desquels les tests prolifératifs ont été réalisés (J18) (**Figure 17A**). L'expression de MPV17 au niveau du transcrit et au niveau protéique ont cette fois été évaluée après 14 puis 18 jours de traitement. Nous avons observé une répression de MPV17 au niveau du transcrit similaire (**Figure 17B**). La répression de la protéine MPV17 est très légèrement inférieure à celle observée lorsque les cellules sont transduites avec un shMPV17 constitutif (95%) (**Figure 17C et D**) mais pas suffisamment pour expliquer qu'une fois de plus, aucune différence au niveau de la capacité de prolifération des cellules silencées pour MPV17 comparées aux cellules contrôles n'a été observée (**Figure 17E, F et G**).

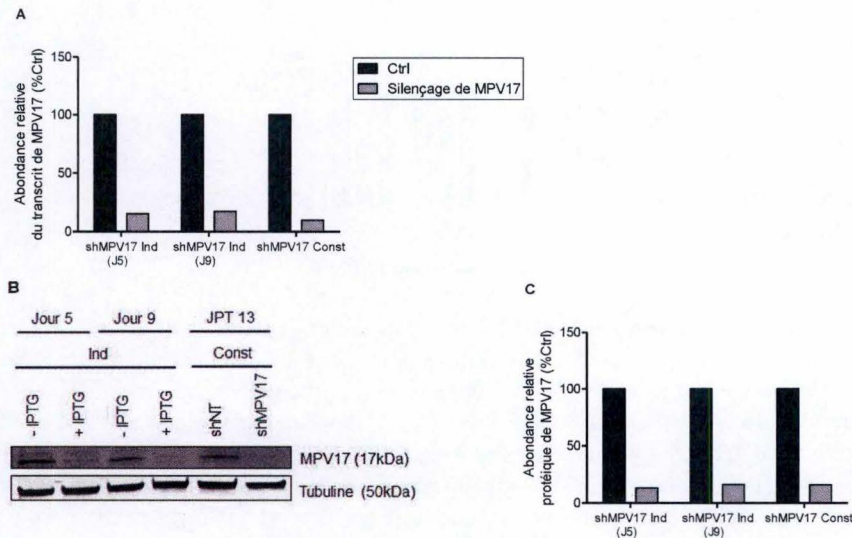
Une troisième tentative pour expliquer pourquoi le phénotype de faible prolifération n'est pas observé dans les cellules shMPV17 Ind concerne la fréquence des changements de milieux. En effet, lorsque les cellules shMPV17 Ind sont incubées avec de l'IPTG, nous changeons quotidiennement le milieu de culture contenant l'IPTG, comme recommandé sur la fiche technique, pour induire de manière robuste l'expression du transgène. Par contre, lorsque les cellules shMPV17 Const sont cultivées, le milieu de culture des cellules n'est changé que tous les deux à trois jours. Ainsi, nous avons émis une première hypothèse qu'un changement quotidien du milieu de culture pouvait éventuellement perturber de potentiels signaux sécrétés dans le milieu de culture induisant un phénotype de faible prolifération. Une seconde hypothèse fut que l'IPTG, malgré qu'il ne soit pas décrit comme étant métabolisé par les cellules (Griffiths et al., 2000), pourrait intervenir dans l'absence de phénotype prolifératif de MPV17, par un mécanisme non décrit.

Pour tester ces hypothèses, les cellules transduites avec un shNT ou un shMPV17 constitutif ont été traitées sans (condition contrôle) ou avec 0,1 mM d'IPTG (condition +IPTG) pendant 4 jours durant lesquels le milieu de culture fut changé tous les jours dans les deux conditions. Aucune perte du phénotype prolifératif n'a été observée (**Figure 18**) dans les cellules shMPV17 constitutif dans les deux conditions testées, suggérant que le changement quotidien de milieu de culture et la présence de l'IPTG n'explique pas l'absence de phénotype prolifératif des cellules shMPV17 Ind.

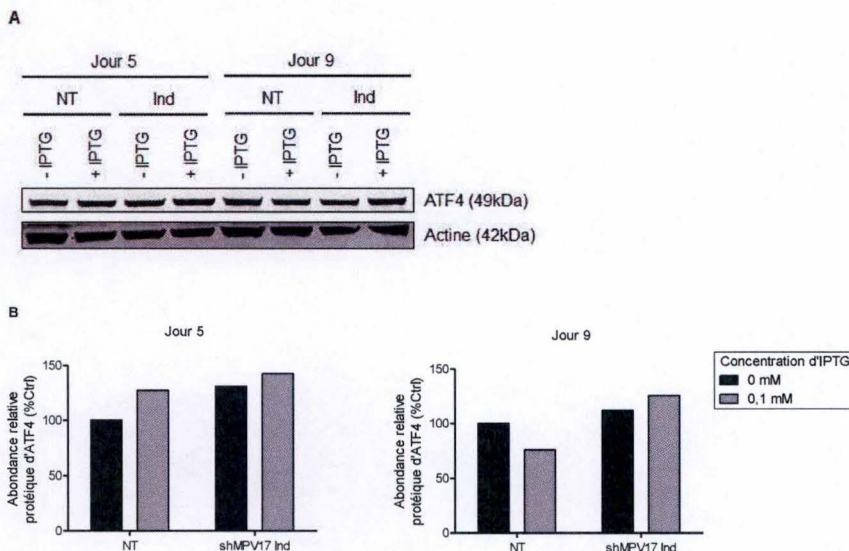
### 5. Comparaison entre un silençage de MPV17 par un shMPV17 constitutif et un shMPV17 inducible

Contre toute attente, nous avons été incapables d'observer le phénotype de faible prolifération associé à MPV17 lorsque ce gène est réprimé avec un shMPV17 à expression inducible. Cette observation est d'autant plus étonnante que les deux shMPV17 possèdent la même séquence et affectent donc les mêmes cibles. Ainsi, nous avons procédé à une série de vérifications concernant les protéines pour lesquelles l'abondance avait précédemment été montrée comme étant modifiée dans les cellules transduites avec un shMPV17 constitutif.



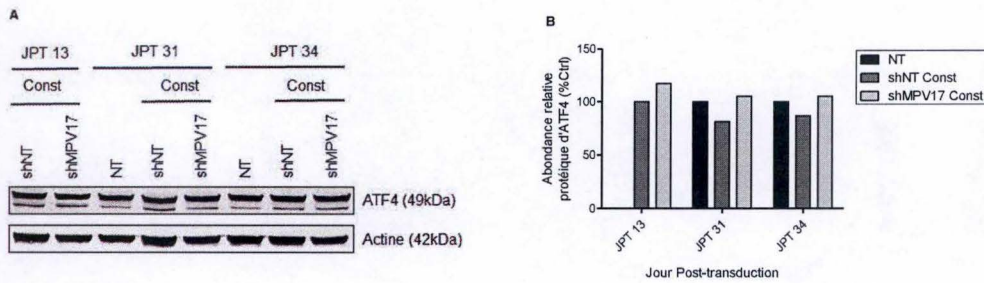


**Figure 19. Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 à expression inducible comparé à un shMPV17 constitutivement exprimé.** Les cellules Huh7 ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement (shRNA Const) exprimé ne ciblant aucune séquence (Ctrl) ou ciblant l'expression de MPV17 (Silencage de MPV17) ou un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par de l'IPTG (shMPV17 Ind). Les cellules transduites avec shMPV17 Ind ont été traitées (Silencage de MPV17) ou non (Ctrl) avec 0,1 mM d'IPTG pendant 5 (J5) ou 9 (J9) jours. **(A)** La répression de MPV17 au niveau du transcrit a été évaluée par RT-qPCR et normalisée par rapport à l'abondance de l'ARNm de la tubuline utilisée comme gène de référence. **(B)** La répression de MPV17 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **(C)** Quantification de l'abondance de la protéine MPV17 normalisée par l'abondance de la tubuline. L'abondance relative de MPV17 au niveau du transcrit **(A)** et de la protéine **(B et C)** est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl) pour les cellules shMPV17 Ind ou transduites avec un shNT Const (Ctrl) pour les cellules shMPV17 Const.



**Figure 20. Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 à expression inducible sur l'abondance de la protéine ATF4.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par de l'IPTG (shMPV17 Ind). Les cellules ont été incubées pendant 5 à 9 jours avec 0,1 mM d'IPTG. **(A)** L'expression d'ATF4 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot avec le lot d'anticorps #4. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Quantification de l'abondance de la protéine ATF4 normalisée par l'abondance de l'actine. L'expression d'ATF4 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl).





**Figure 21. Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 constitutivement exprimé sur l'abondance de la protéine ATF4 au cours de la perte du phénotype.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). **(A)** L'abondance protéique d'ATF4 a été évaluée par Western Blot avec le lot d'anticorps #4 au cours des jours post-transduction (JPT). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Quantification de l'abondance de la protéine ATF4 normalisée par l'abondance de l'actine. L'expression d'ATF4 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules shNT Const pour le JPT9 et par rapport aux cellules NT pour les JPT31 et JPT34.



### 5.1 Comparaison de la répression de la protéine MPV17

Une vérification de la capacité des deux shMPV17 à réprimer MPV17 a été réalisée lors d'expériences simultanées. Les cellules silencées pour MPV17 à l'aide d'un shMPV17 inductible ont été comparées à des cellules transduites avec un shMPV17 inductible non traitées à l'IPTG, tandis que les cellules silencées pour MPV17 à l'aide d'un shMPV17 constitutif ont été comparées à des cellules transduites avec un shNT constitutif. Comme le montre la **Figure 19**, la diminution de l'expression de MPV17 au niveau du transcrit (**Figure 19A**) et au niveau protéique (**Figure 19B, C**) est comparable lorsque les cellules sont transduites avec un shMPV17 inductible et constitutif.

### 5.2 Comparaison des effets d'un silençage de MPV17 sur des protéines précédemment étudiées et considérées comme étant impliquées dans le phénotype prolifératif de MPV17

Des résultats antérieurement obtenus au laboratoire ont permis d'axer les recherches sur certaines protéines en particulier pour expliquer les mécanismes moléculaires associés au phénotype prolifératif. Les protéines précédemment investiguées sont, entre autres, ATF4 et MNK1. C'est pourquoi nous avons tenté d'évaluer comment ces protéines étaient affectées lorsqu'une répression de MPV17 est provoquée par un shMPV17 inductible.

#### 5.2.1 ATF4

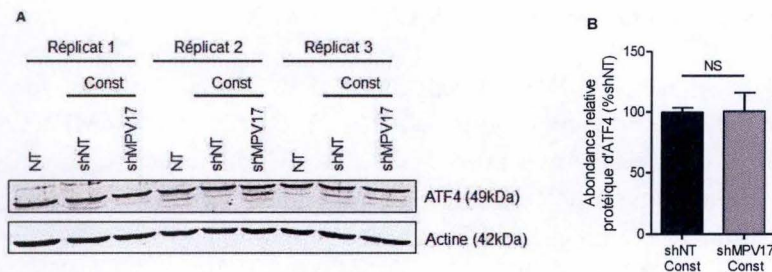
L'analyse du RNA-Seq précédemment effectuée sur des cellules Huh7 silencées pour MPV17 avec un shMPV17 constitutif a prédit une inhibition de l'activité d'ATF4 dans ces cellules comparées à des cellules transduites avec un shNT. En accord avec le RNA-Seq, des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont montré une diminution systématique de 60 à 70% de l'abondance protéique d'ATF4 dans trois lignées cancéreuses différentes silencées pour MPV17 dont les cellules Huh7 (**Figure 8, Introduction**).

Basée sur ces résultats antérieurs, une évaluation de l'expression d'ATF4 dans des cellules silencées pour MPV17 avec un shMPV17 inductible a été effectuée. Aucune différence de l'abondance protéique d'ATF4 n'a été observée dans ces cellules shMPV17 Ind comparées aux trois conditions contrôles (**Figure 20**). Ce résultat a mis en doute le lien entre la diminution de l'expression d'ATF4 et la répression de MPV17 menant au phénotype prolifératif. Ainsi, nous nous sommes demandé si une expression normale d'ATF4 pouvait expliquer l'absence de phénotype prolifératif dans les cellules shMPV17 Ind.

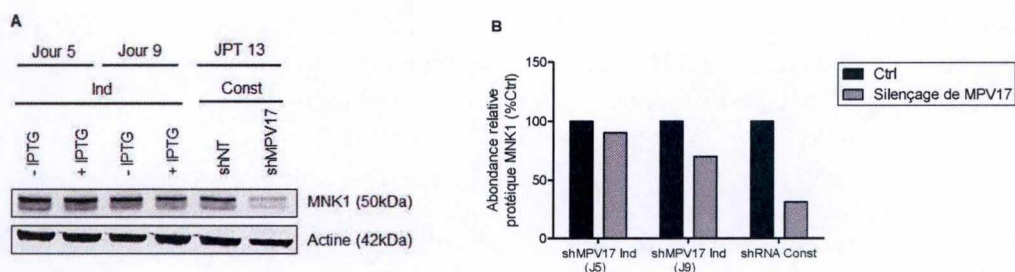
Pour répondre à cette question, nous avons évalué l'expression d'ATF4 au cours de la perte du phénotype prolifératif observée dans les cellules shMPV17 Const. En effet, un retour à la normale de l'expression d'ATF4 au cours des jours post-transduction pourrait potentiellement expliquer comment les cellules silencées pour MPV17 s'adaptent au phénotype prolifératif.

Contre toute attente, aucune diminution de l'expression d'ATF4 n'a été observée au niveau protéique, même au JPT13 (**Figure 21**) lorsque les cellules silencées pour MPV17 présentent toujours un phénotype de faible prolifération (**Figure 9**). Ce résultat va à l'encontre des résultats précédemment obtenus au laboratoire. Nous avons alors suspecté un problème d'anticorps contre ATF4 car celui utilisé lors des résultats obtenus dans les **Figures 20 et 21** provenait de





**Figure 22. Effet de la répression de MPV17 par un shMPV17 constitutivement exprimé sur l'abondance de la protéine ATF4.** Les cellules Huh7 ont été non transduites (NT) ou transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement exprimé ne ciblant aucune séquence (shNT Const) ou ciblant l'expression de MPV17 (shMPV17 Const). **(A)** L'abondance protéique d'ATF4 a été évaluée par Western Blot avec le lot d'anticorps #4. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Quantification de l'abondance de la protéine ATF4 normalisée par l'abondance de l'actine. L'expression d'ATF4 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules shNT Const. Les p values ont été obtenues en utilisant un t test non apparié ( $p < 0,05$ ) et aucune différence significative (NS) a été observée pour chaque réplikat shMPV17 Const par rapport shNT Const. SD calculé à partir de 3 réplicats indépendants ( $n = 3$ ).



**Figure 23. Effet de la répression de MPV17 sur l'abondance de la protéine MNK1.** Les cellules Huh7 ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA constitutivement (shRNA Const) exprimé ne ciblant aucune séquence (Ctrl) ou ciblant l'expression de MPV17 (Silençage de MPV17) ou un vecteur lentiviral contenant un shRNA ciblant MPV17 dont l'expression est inducible par de l'IPTG (shMPV17 Ind). Les cellules transduites avec shMPV17 Ind ont été traitées (Silençage de MPV17) ou non (Ctrl) avec 0,1 mM d'IPTG pendant 5 (J5) ou 9 (J9) jours. **(A)** L'expression de MNK1 au niveau protéique a été évaluée par Western Blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Quantification de l'abondance de la protéine MNK1 normalisée par l'abondance de l'actine. L'expression de MNK1 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules NT non traitées avec de l'IPTG (Ctrl) pour les cellules shMPV17 Ind ou transduites avec un shNT Const (Ctrl) pour les cellules shMPV17 Const ( $n=1$ ).



la même firme mais d'un nouveau lot que celui précédemment utilisé pour mettre en évidence la diminution de l'expression d'ATF4 dans les cellules shMPV17 Const.

Une évaluation de l'abondance protéique d'ATF4 avec le nouvel anticorps sur des anciens extraits protéiques de cellules shMPV17 Const où la diminution de l'expression d'ATF4 avait été observée (**Figure 8, Introduction**), montre que plus aucune diminution d'ATF4 n'est observée (**Figure 22**). Ces résultats inattendus pourraient donc être dus à un problème d'anticorps. L'étape suivante sera de déterminer quel anticorps est capable d'identifier correctement la protéine ATF4.

### 5.2.2 MNK1

Un RPPA réalisé sur des cellules Hep3B et A549 silencées pour MPV17 a permis d'analyser l'abondance de 297 protéines impliquées dans le cycle cellulaire dans le but d'identifier les protéines pouvant avoir un rôle dans le phénotype prolifératif de MPV17 par arrêt du cycle cellulaire. Le choix s'est porté, entre autre, sur la protéine MNK1. Des résultats précédemment obtenus au laboratoire ont indiqué une réduction de 50% et de 70% de l'abondance protéique de MNK1 et de PeIF4E respectivement, dans des cellules shMPV17 Const (M. Canonne, Données non montrées). Ainsi, la diminution de l'expression de MNK1 ainsi que celle de la forme phosphorylée d'eIF4E ont été précédemment investiguées pour expliquer le phénotype prolifératif. C'est pourquoi nous avons évalué le niveau protéique de MNK1 dans les cellules shMPV17 Ind. La **Figure 23** montre que MNK1 a une abondance protéique diminuée de 70% dans les cellules shMPV17 Const comparées aux cellules shNT Const comme déjà montré par les résultats précédemment obtenus au laboratoire. Une plus légère diminution de 30% est observée dans les cellules shMPV17 Ind traitées pendant 9 jours avec de l'IPTG comparées aux cellules shMPV17 non traitées (**Figure 23**) suggérant que la protéine MNK1 est sensiblement moins affectée dans des cellules shMPV17 Ind comparée à des cellules shMPV17 Const.



## IV. DISCUSSION



#### IV. Discussion

La fonction de la protéine MPV17 est peu connue. Les études du groupe de Spinazzola ont décrit que MPV17 pourrait promouvoir la voie mitochondriale de sauvetage des nucléotides. Cette voie permet de maintenir la réserve de dNTPs nécessaires à la réplication de l'ADNmt dans les cellules non prolifératives, dont la voie de synthèse *de novo* des nucléotides est inactive. En outre, les mutations de MPV17 sont connues pour provoquer des SDAM caractérisés par une sévère diminution du nombre de copie d'ADNmt de façon tissu-spécifique. Cette hypothétique fonction de MPV17 dans la promotion de la voie de sauvetage mitochondriale des nucléotides et une sévère déplétion de l'ADNmt lorsque le gène MPV17 est muté paraît cohérente. Celle-ci l'est d'autant plus lorsque l'on considère les fonctions des homologues de MPV17 chez la levure, le poisson zèbre et la souris. En effet, chez le poisson zèbre par exemple, l'homologue de MPV17 serait un canal permettant à la guanosine, précurseur de la dGTPs, d'être transportée du cytosol à la mitochondrie. Cependant, dans les cellules prolifératives telles que les cellules Huh7 (M. Canonne, Données non montrées) et les fibroblastes prolifératifs (Dalla Rosa et al., 2016), une répression de MPV17 n'affecte pas le contenu en ADNmt. Cela peut s'expliquer par le fait que la réserve de dNTPs mitochondriaux est principalement maintenue par la voie de biosynthèse des nucléotides *de novo*, plutôt que par la voie mitochondriale de sauvetage des nucléotides, lorsque les cellules sont en division. En effet, la réserve de dNTPs mitochondriaux est principalement maintenue par la voie mitochondriale de sauvetage des nucléotides lorsque les cellules sont quiescentes et ne peuvent pas utiliser la voie *de novo* car contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADNmt continue à se répliquer indépendamment des divisions cellulaires. Dans cette étude, nous étudions la protéine MPV17 dans le contexte du cancer, un domaine encore inexploré.

Les résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire indiquent que les cellules silencées pour MPV17 présentent un phénotype de faible prolifération par rapport aux cellules cancéreuses transduites avec un shNT (contrôle). Par conséquent, nous essayons d'expliquer comment la protéine MPV17 est impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses par des mécanismes différents de son implication dans la voie mitochondriale de sauvetage des nucléotides. En utilisant l'analyse des données de RNA-Seq, nous avons sélectionné deux candidats potentiellement impliqués dans ce phénotype de faible prolifération : les voies TGF- $\beta$  et ATF4, prédites par l'analyse IPA comme étant activée et inhibée dans les cellules silencées pour MPV17, respectivement.

L'intérêt que nous portons à TGF- $\beta$  est dû au z-score élevé qu'a indiqué l'analyse IPA. Cela signifie qu'un nombre important de gènes ciblés par TGF- $\beta$ , c'est-à-dire 451 gènes pour être précis, ont leur expression affectée de manière significative dans les cellules Huh7 silencées pour MPV17 comparées aux cellules Huh7 shNT. TGF- $\beta$  est une cytokine aux fonctions multiples et paradoxales. Dans les cellules saines et lors des stades précoces de la tumorigenèse, TGF- $\beta$  a une fonction anti-tumorale tandis que durant les stades plus tardifs de la tumorigenèse, TGF- $\beta$  a une fonction pro-tumorale. Cela est possible en conséquence de stratégies qui sont mises en place par les cellules cancéreuses pour résister aux fonctions anti-tumorales de TGF- $\beta$ .

Les cellules Huh7 que nous avons utilisées lors de ce mémoire sont des cellules CHC. Les cellules Huh7 ont été décrites comme étant la lignée CHC la moins invasive et exprimant le plus de marqueurs épithéliaux en opposition avec la lignée CHC Mahlavu qui est



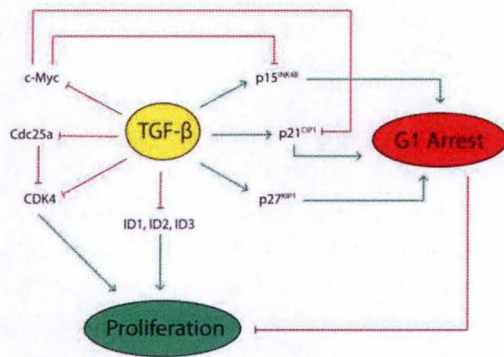
particulièrement invasive et présente un phénotype mésenchymateux caractéristique des cellules cancéreuses malignes (Yang et al., 2009). Basé sur ces données, nous pouvons supposer que les cellules Huh7 seraient représentatives des cellules cancéreuses qui sont encore au stade précoce de la tumorigenèse, précédant l'étape durant laquelle TGF- $\beta$  devient pro-tumorale et favorise la TEM (Fabregat et al., 2016). Les fonctions de suppresseur de tumeur de TGF- $\beta$  incluent l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses pré-malignes par arrêt du cycle cellulaire. Cette fonction est possible grâce à la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire par TGF- $\beta$ , tels que *CDKN2B*, *MYC* et *RB1*. Afin de déterminer si la voie de TGF- $\beta$  est impliquée dans le phénotype de faible prolifération, l'intention initiale était d'utiliser des anticorps neutralisants contre TGF- $\beta$ . Cependant, pour déterminer les conditions d'utilisation des anticorps neutralisants, il est nécessaire de réaliser des tests qui permettent d'évaluer leur efficacité. Ces tests adressent la voie canonique de la transduction du signal de TGF- $\beta$ , c'est-à-dire la voie des SMADs. C'est pourquoi nous avons commencé par étudier celle-ci.

La quantification par immunofluorescence des protéines SMADs suggère un niveau accru de signal des protéines SMADs, à l'exception de SMAD2, dans le noyau des cellules Huh7 silencées pour MPV17 par rapport aux cellules Huh7 shNT. Cependant, la seule présence des protéines SMADs dans le noyau n'est pas suffisante pour conclure à une régulation active de gènes par des voies dépendantes des SMADs. Pour déterminer si les protéines SMADs contrôlent efficacement la transcription des gènes cibles suite au signal de TGF- $\beta$ , nous avons utilisé un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant quatre copies de Smad Binding Element (SBE) (Zawel et al., 1998). Contre toute attente, une première évaluation de l'activité des SMADs a indiqué une diminution de l'activation du rapporteur SMAD dans les cellules shMPV17 comparées aux cellules shNT. Ce résultat était inattendu étant donné le z-score élevé pour TGF- $\beta$  établi par l'analyse IPA. Nous nous serions attendus à observer une augmentation de l'activité de la voie des SMADs dans les cellules silencées pour MPV17. Une deuxième évaluation a montré qu'aucune différence de l'activation du rapporteur SMAD était observée dans les cellules shMPV17 comparées aux cellules shNT. Suite à ces deux résultats, il est difficile de conclure à une quelconque régulation des SMADs dans les cellules silencées pour MPV17. Des réplicats supplémentaires seront donc nécessaires afin de déterminer comment l'activité des SMADs est réellement affectée suite au silençage de MPV17.

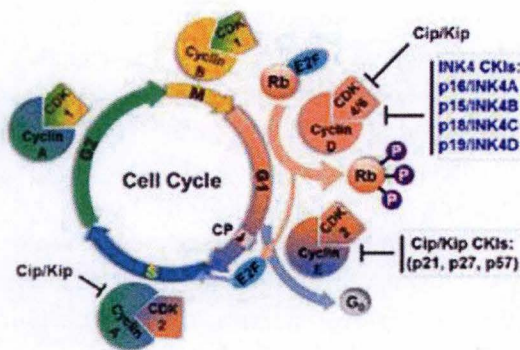
S'il s'avère que l'activité des SMADs est bel et bien diminuée, nous pourrions plutôt explorer les voies indépendantes de SMADs qui peuvent être activées par la signalisation TGF- $\beta$ . Dans le cas où nous confirmons que la voie des SMADs est activée dans les cellules silencées pour MPV17, nous aurons besoin de vérifier qu'elle est activée par TGF- $\beta$ , et non par d'autres membres de la famille des TGF- $\beta$  capables d'activer la voie des SMADs tels que les Activine et les Nodal (Kanamaru et al., 2003; Kumar et al., 2001). Dans ce but, nous pourrions utiliser des anticorps neutralisant TGF- $\beta$  pour garantir que la voie des SMADs est activée par TGF- $\beta$  dans les cellules silencées pour MPV17 (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Ling, 2003). De plus, les anticorps neutralisants seront des outils intéressants pour évaluer la contribution des voies activées par le TGF- $\beta$  dans le phénotype de faible prolifération des cellules shMPV17.

Une autre approche serait d'évaluer l'activité des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire dont l'expression du gène est régulée par TGF- $\beta$ . Comme expliqué précédemment, TGF- $\beta$  possède une fonction antiproliférative. Cette fonction est possible grâce





**Figure 1. Fonction anti-proliférative de TGF-β.** Cibles de TGF-β dans la fonction antiproliférative de celui-ci par arrêt du cycle cellulaire et inhibition de la prolifération. Cdc25 : Cell division cycle 25. CDK4 : Cyclin Dependent-Kinase 4. ID : Inhibitor of DNA-Binding (Huang and Blobe, 2016).

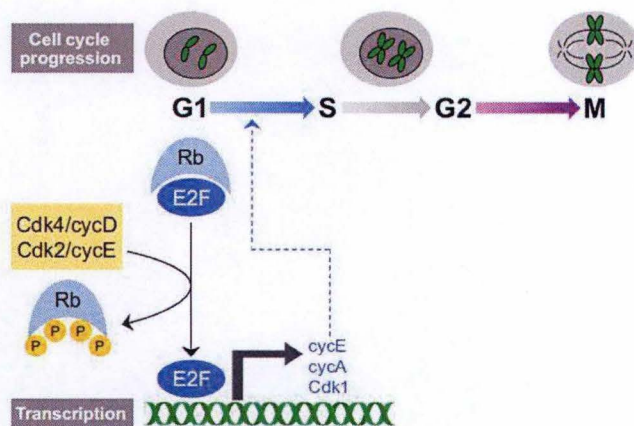


**Figure 2. Les inhibiteurs de CDKs (CKIs).** Il existe deux familles de CKIs : Ink4 et Cip/Kip. La famille Ink4 comprend p15, p16, p18 et p19 et inhibe l'activité des Cdk4/6 qui régule la progression du cycle de la phase G1 à la phase S. La famille Cip/Kip inclut p21, p27 et p57 et inhibe l'activité de Cdk2 qui régule la progression du cycle cellulaire dans la phase S (Lutful Kabir et al., 2015).

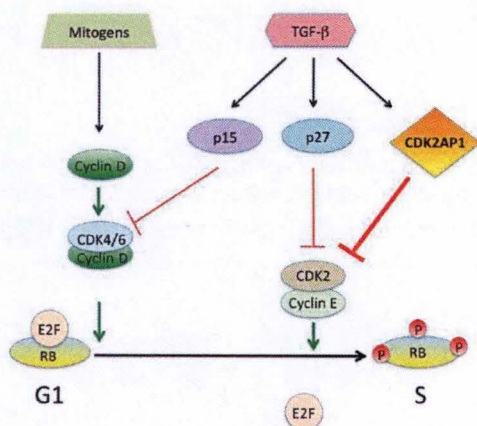
Gène	Protéine	Log <sub>2</sub> (Fold Change)	p-value
CDKN2B	p15 <sup>INK4B</sup>	1,321	2,54 <sup>-31</sup>
CDKN1C	p57 <sup>KIP2</sup>	0,871	3,30 <sup>-4</sup>
CDKN2C	p18 <sup>INK4C</sup>	0,739	3,27 <sup>-6</sup>
RB1	Protéine Rétinoblastome	0,542	4,30 <sup>-5</sup>
CDK2AP1	Cdk2 Associated Protein 1	0,372	3,84 <sup>-4</sup>
MYC	c-Myc	-1,165	1,80 <sup>-9</sup>
CDK4	CDK4	-0,430	3,28 <sup>-12</sup>
CDC25C	CDC25C	-0,642	1,09 <sup>-4</sup>

**Tableau 1. Analyse du séquençage d'ARN.** Le séquençage d'ARN a été réalisé sur des cellules Huh7 transduites avec un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17) ou ne ciblant aucune séquence (shNT). Ce séquençage d'ARN a été réalisé par M. Canonne au Genomics Core KU Leuven sur quatre réplicats biologiques indépendants. Dans cette figure sont représentés les gènes ciblés par TGF-β et ayant un niveau de transcrit modifié dans les cellules silencées pour MPV17 comparées aux cellules shNT (Données RNA-Seq).



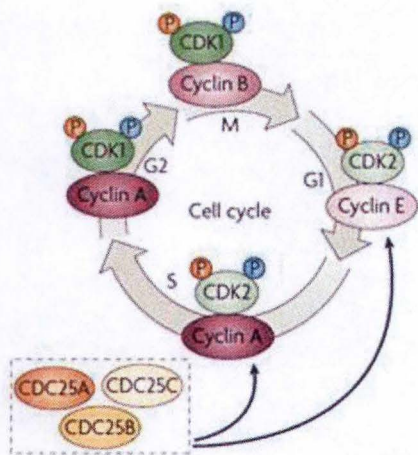


**Figure 3. Fonction et régulation de la protéine du rétinoblastome (Rb).** Rb séquestre E2F lorsqu'il est actif et empêche celui-ci de réguler la transcription de gènes codant pour des protéines qui exercent un contrôle positif sur la progression du cycle cellulaire et permettre l'entrée dans la phase S. Les complexes Cdk4/CyclinD et Cdk2/CyclinE sont capables de phosphoryler Rb ce qui permettra la libération d'E2F (Lim and Kaldis, 2013).

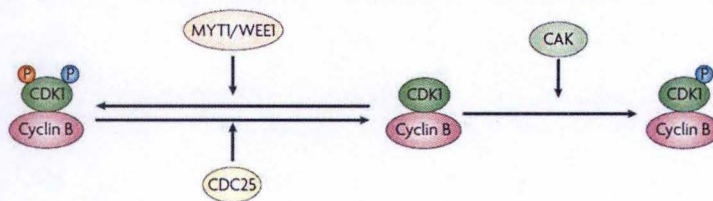


**Figure 4. La Cdk2 associated protein 1 (CDK2AP1).** Des facteurs mitogènes activent les complexes Cdk/Cycline. Ceux-ci régulent la progression du cycle cellulaire, entre autres, par la phosphorylation de Rb. TGF-β régule positivement des CKIs ainsi que CDK2AP1 capable d'inhiber spécifiquement la Cdk2 (Wong et al., 2012).





**Figure 5. La protéine cell division cycle 25.** Il existe 3 types de CDC25 : CDC25A, B et C. CDC25 est une phosphatase qui régule l'activité des Cdk2 en les déphosphorylant (Boutros et al., 2007).



**Figure 6. Régulation de l'activité des Cdk.** Les Cdk sont inactivés lorsqu'ils sont phosphorylés par MYT1 et WEE1 sur les résidus T14 et Y15. CDC25 est une phosphatase capable d'activer les Cdk en les déphosphorylant sur les deux résidus. Une activation supplémentaire est nécessaire par la Cyclin Activating Kinase (CAK) sur le résidu T161 (Boutros et al., 2007).



à l'activation ou à l'inhibition de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (**Figure 1**). TGF- $\beta$  régule positivement les gènes *CDKN2B*, *CDKN1A* et *CDKN1B* codant pour les inhibiteurs de CDKs p15<sup>INK4B</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>, respectivement. Les CDKs forment des complexes avec les cyclines et leur activité est nécessaire pour progresser dans les différents stades du cycle cellulaire (**Figure 2**). Les inhibiteurs de CDKs (CKIs) sont des régulateurs négatifs de l'activité de ces complexes CDKs. La protéine p15<sup>INK4B</sup>, et les autres CKIs de la famille des INK4s que sont p16<sup>INK4A</sup>, p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup>, inhibent l'activité des Cdk4/6 tandis que les protéines p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> ainsi que p57<sup>KIP2</sup> inhibent l'activité de Cdk2 (**Figure 2**). Ces CKIs provoquent donc tous un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en bloquant les CDKs liés à la progression de la phase G1 en phase S. Or il s'avère, d'après l'analyse du RNA-Seq par IPA, que les gènes *CDKN2B*, *CDKN2C* et *CDKN1C* codant pour les protéines p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> et p57<sup>KIP2</sup>, respectivement, sont des gènes ciblés par TGF- $\beta$  ayant une expression augmentée (**Tableau 1**). Dans certains cas, TGF- $\beta$  peut inhiber directement l'expression de CDKs telles que Cdk4 (Ewen et al., 1993) (**Figure 1**). Or le gène de *CDK4* possède un niveau de transcrit plus faible dans les cellules silencées pour MPV17 comparées aux cellules contrôles (shNT) (**Tableau 1**).

D'autres acteurs de la régulation du cycle cellulaire ont été détectés comme étant différentiellement exprimés d'après les données de RNA-Seq et prédits pour être affectés par le signal TGF- $\beta$  selon l'analyse IPA. Ces gènes sont *RBI*, *CDK2AP1* et *CDC25C* codant pour les protéines du rétinoblastome, Cdk2 associated protein 1 et l'isoforme C de la protéine cell division cycle 25, respectivement.

La protéine du rétinoblastome (pRB) est une protéine qui exerce un contrôle négatif sur le cycle cellulaire. pRB séquestre la protéine E2F qui régule la transcription de gènes codant pour des régulateurs du cycle cellulaire requis pour progresser de la phase G1 à la phase S, tels que la Cdk1, la cycline A et la cycline E (**Figure 3**) (Lim and Kaldis, 2013). C'est donc une protéine considérée comme suppresseur de tumeur. Le gène *RBI* codant pour cette protéine est régulé positivement dans les cellules silencées pour MPV17 comparées aux cellules contrôles selon le RNA-Seq (**Tableau 1**).

Cdk2AP1 est une protéine capable de bloquer l'activité de la Cdk2. Celle-ci est requise pour phosphoryler pRB afin de libérer la protéine E2F et permettre la progression du cycle cellulaire. Ainsi, si la protéine Cdk1AP1 est active et bloque l'activité de la Cdk2, pRB n'est pas phosphorylé et peut séquestrer E2F et ainsi, inhiber la progression du cycle cellulaire (**Figure 4**) (Wong et al., 2012). L'expression du gène *CDK2AP1* se trouve être régulée positivement d'après le RNA-Seq dans les cellules silencées pour MPV17 comparées aux cellules contrôles (**Tableau 1**).

La protéine CDC25 intervient dans l'activation des CDKs (**Figure 5**). Lorsque les CDKs sont phosphorylées sur les résidus T14 and Y15 par les protéines WEE1 et MYT1, elles sont dans un état inactivé et ne permettent pas la progression du cycle cellulaire. CDC25 est une phosphatase qui intervient dans la régulation des CDKs en déphosphorylant les deux résidus T14 et Y15 des CDKs (Boutros et al., 2007). Pour être totalement activés, les CDKs doivent être phosphorylés par la CDK-activating kinase (CKA) sur le résidu T161 (**Figure 6**). Or le gène codant pour une des trois isoformes de CDC25 est négativement régulé dans les cellules silencées pour MPV17 comparées aux cellules contrôles selon l'analyse du RNA-Seq (**Tableau**



1). De plus, la protéine CAK est connue pour être régulée négativement par TGF- $\beta$  (Nagahara et al., 1999).

TGF- $\beta$  régule également négativement des gènes qui exercent un contrôle positif sur le cycle cellulaire dont le gène *MYC* codant pour la protéine c-Myc (**Figure 13, Introduction**). La protéine c-Myc est un facteur de transcription principalement connu pour réguler positivement des gènes qui favorisent la prolifération cellulaire mais également des fonctions telles que la glycolyse et l'initiation de la traduction. C-Myc contrôle la progression du cycle cellulaire en régulant positivement l'expression de gènes codant pour des cyclines dont les cyclines A, D et E, pour des protéines régulant l'activité des CDKs telles que CDC25 (Dang, 1999) et réprime l'expression de gènes codant pour des CKIs incluant p15<sup>INK4B</sup>, p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> (Miller et al., 2012). Le gène *MYC* est lui-même régulé négativement au niveau du transcrit par TGF- $\beta$  (Yagi et al., 2002) constituant ainsi un mécanisme par lequel TGF- $\beta$  exerce son effet d'inhibition de la prolifération. Le gène *MYC* est fortement réprimé dans les cellules silencées pour MPV17 comparées aux cellules contrôles selon le RNA-Seq (**Tableau 1**).

Toutes ces données fournies par le RNA-Seq et par la littérature sont des pistes à explorer pour expliquer les mécanismes sous-jacents à un phénotype de faible prolifération dans les cellules silencées pour MPV17. L'abondance protéique et l'activité de toutes ces cibles de TGF- $\beta$  peuvent être évaluées afin de déterminer si le phénotype de faible prolifération observé dans les cellules silencées pour MPV17 est provoqué par un ralentissement du cycle cellulaire provoqué par un signal de TGF- $\beta$ . Cette évaluation devra être faite en se focalisant en priorité sur les gènes dont l'expression est affectée d'après le RNA-Seq (**Tableau 1**). Une autre approche pour identifier si les cellules silencées pour MPV17 sont bloquées à la phase G1 du cycle cellulaire est de déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire sont retardées les cellules shMPV17 comparées aux cellules shNT. Pour ce faire, la cytométrie de flux peut être utilisée. Cette technique a été précédemment réalisée au laboratoire en utilisant le bromodésoxyuridine (BrdU) comme analogue de structure de la thymidine. Bien que les résultats indiquent pour l'instant un retard en phase G2/M, d'autres expériences utilisant la cytométrie de flux sont prévues pour confirmer ce retard. Cependant une évaluation de l'abondance des cibles de TGF- $\beta$  intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 reste intéressante.

La seconde voie étudiée lors de ce travail concernant les mécanismes moléculaires par lesquels la répression de MPV17 ralentit la prolifération des cellules cancéreuses est associée à ATF4. La régulation négative d'ATF4 prédite par l'analyse de RNA-Seq a été confirmée par Western Blot dans trois différentes lignées de cellules cancéreuses (Huh7, Hep3B, A549) silencées pour MPV17 dont les cellules Huh7 (**Figure 8, Introduction**). Ces robustes résultats suggèrent qu'ATF4 pourrait jouer un rôle dans le phénotype de faible prolifération des cellules silencées pour MPV17. En tentant d'expliquer comment la diminution de l'expression d'ATF4 pourrait être impliquée dans ce phénotype, nous avons commencé à étudier la fonction d'ATF4 dans l'homéostasie oxydative, en sachant qu'une régulation négative d'ATF4 conduit à une augmentation du stress oxydatif et pourrait expliquer le taux de prolifération réduit dans les cellules silencées pour MPV17 (Harding et al., 2003; Ye et al., 2010). Une étude publiée par Huggins *et al.* a montré que le facteur de transcription C/EBP $\gamma$  est un partenaire obligatoire pour ATF4 dans la régulation de nombreux gènes liés aux réponses au stress et que des MEFs C/EBP $\gamma$ <sup>-/-</sup> présentaient une capacité de prolifération plus faible en raison d'une diminution de l'apport en glutathion. Sur base de cette étude, nous avons tenté une supplémentation en NAC capable de restaurer le taux de prolifération dans les MEFs C/EBP $\gamma$ <sup>-/-</sup> par un



réapprovisionnement du GSH (Huggins et al., 2015). Cependant, la supplémentation en NAC n'a pas permis de restaurer la prolifération dans les cellules silencées pour MPV17 dans notre cas. Néanmoins, nous ne pouvons pas tirer de conclusion définitive sur cette expérience, car nous n'avons aucune indication que la supplémentation en NAC était efficace pour augmenter le niveau de GSH, ni même qu'il y ait une diminution des niveaux de GSH dans les cellules silencées pour MPV17. De plus, le phénotype étudié dans l'article de Huggins *et al.* n'est pas dû aux mêmes conditions expérimentales que la nôtre. Le faible taux de prolifération dans les MEFs est causé par un C/EBP $\gamma$  invalidé alors que dans notre étude, il est dû à la régulation négative de MPV17 qui affecte l'expression d'ATF4, entre autres. Si les niveaux de GSH ne sont pas affectés dans les cellules silencées pour MPV17, la régulation négative d'ATF4 pourrait affecter la prolifération cellulaire par d'autres voies métaboliques que la perte d'homéostasie oxydative, comme l'altération de l'importation des acides aminés et la synthèse des purines (Ben-Sahra et al., 2016; Harding et al., 2003).

Cependant, différentes supplémentations ont été réalisées au laboratoire afin de tenter de restaurer la prolifération des cellules silencées pour MPV17, comprenant des supplémentations en folate, en désoxynucléosides, en acides aminés non essentiels et en  $\beta$ -mercaptoéthanol (M. Canonne, Données non publiées), mais aucune d'elles n'a permis de restaurer la prolifération cellulaire. Par conséquent, il faudrait tenter de restaurer le niveau d'expression d'ATF4 dans les cellules silencées pour MPV17 afin de déterminer si ATF4 est un acteur majeur dans le phénotype de faible prolifération des cellules silencées pour MPV17. En effet si une expression normale d'ATF4 permet de restaurer la prolifération dans ces cellules, cela indiquera qu'ATF4 joue effectivement un rôle dans l'effet provoqué par une répression de l'expression de MPV17 sur les cellules cancéreuses.

L'objectif de la deuxième partie du travail était de produire une lignée cellulaire Huh7 dont la répression de MPV17 est inducible. La mise en place de cette répression inducible de MPV17 était nécessaire suite à l'observation de la perte progressive du phénotype de faible prolifération dans les cellules où MPV17 est silencée de manière constitutive. Etant donné que le shMPV17 inducible est apte à réprimer l'expression de MPV17 de façon efficace, cette adaptation des cellules au silençage de MPV17 ne s'explique pas par une perte de l'efficacité du shRNA qui aurait pu être provoquée suite à la méthylation du promoteur régulant l'expression du shMPV17 comme cela a déjà été observée dans certaines études (Selvakumar et al., 2012). L'adaptation ne s'explique pas non plus par une mise en place de stratégies permettant un sauvetage de l'expression de MPV17 par les cellules transduites pour contrecarrer et compenser la répression.

La construction de cette lignée s'est basée sur l'utilisation d'un shMPV17 à expression inducible par de l'IPTG. Cette répression étant a priori dose-dépendante (Deans et al., 2007; Wu et al., 2007), nous avons d'abord testé différentes concentrations d'IPTG, l'agent inducteur utilisé pour induire l'expression du shMPV17. Nous avons démontré qu'une faible concentration de 0,1 mM d'IPTG était suffisante pour réduire l'expression de MPV17 dans les cellules Huh7 transduites avec un shMPV17 inducible à un niveau comparable à celui des cellules silencées pour MPV17 avec un shMPV17 constitutif, tant au niveau du transcrit qu'au niveau protéique. L'étape suivante fut de déterminer si cette répression entraînait un phénotype de faible prolifération comme observée dans les cellules silencées pour MPV17 avec le shMPV17 constitutif. Contre toute attente, la répression de MPV17 par un shMPV17 inducible



dans les cellules Huh7 transduites n'a permis aucune diminution de la prolifération dans ces cellules comparées aux cellules contrôles malgré une répression de MPV17 allant jusqu'à 95% au niveau protéique.

Suite à cette observation, plusieurs tentatives pour optimiser la technique et tenter d'expliquer cette différence de phénotype ont été effectuées. Tout d'abord, nous avons voulu vérifier si l'IPTG pouvait avoir des effets secondaires et intervenir dans le phénotype, bien que celui-ci ne soit pas connu pour être métabolisé par l'organisme (Griffiths et al., 2000). Un changement de milieu de culture journalier pouvait éventuellement perturber de potentiels signaux sécrétés dans le milieu de culture induisant le phénotype de faible prolifération. Nous avons simultanément testé ces deux hypothèses sur les cellules shNT et shMPV17 constitutif. Cependant, ces expériences n'ont pas montré que le phénotype de faible prolifération était affecté par la présence d'IPTG ni par un changement de milieu de culture quotidien dans les cellules shMPV17 constitutif.

Ensuite, une comparaison attentive des protocoles suivis pour analyser la prolifération des cellules silencées pour MPV17 en utilisant un shMPV17 constitutif et shMPV17 inducible a révélé que les tests prolifératifs n'étaient pas réalisés avant 13 jours de répression de MPV17 dans le cas du shMPV17 constitutif. En effet, les cellules shMPV17 constitutif ne peuvent êtreensemencées qu'à la fin du processus de transduction lentivirale et de sélection des cellules transduites qui dure 9 jours (**Figure 1, Matériel et Méthodes**) et l'analyse de la prolifération cellulaire ne se fait que 4 jours après l'ensemencement des cellules. Pour les cellules shMPV17 inducible par contre, les tests prolifératifs étaient réalisés après 9 jours de répression de MPV17 (**Figure 14A, Résultats**). C'est pourquoi nous avons finalement traité les cellules shMPV17 inducible avec l'IPTG pendant 14 jours avant d'analyser la prolifération de ces cellules. Cependant, cela n'a pas permis de montrer un phénotype de faible prolifération dans les cellules silencées pour MPV17. Une dernière tentative fut de vérifier les acteurs moléculaires déjà démontrés comme étant affectés dans les cellules shMPV17 constitutive, c'est-à-dire ATF4 et MNK1. Nous avons pu montrer que l'abondance protéique de MNK1 était légèrement diminuée de 30% dans les cellules shMPV17 inducible tandis que dans les cellules shMPV17 constitutif, l'abondance protéique de MNK1 est diminuée de 70%. Pour ATF4, nous n'avons cependant pas réussi à montrer une diminution de l'abondance protéique dans les cellules shMPV17 inducible pourtant observé dans les cellules shMPV17 constitutif. Toutefois, cela peut s'expliquer par le changement de lot d'anticorps utilisé pour révéler ATF4 comme expliqué précédemment.

Toutes ces observations sont d'autant plus étonnantes que la séquence du shMPV17 constitutif et inducible est la même et devrait donc affecter les mêmes cibles. Une explication possible serait que l'expression d'un des deux shMPV17 constitutif ou inducible est plus élevée dans les cellules transduites. Cela fournirait une explication, car suite à une analyse utilisant l'outil BLAST, il a été révélé que la séquence ciblée par les deux shMPV17 pouvait éventuellement toucher un ARN non codant (ARNnc) à la fonction non identifiée. Cet ARNnc pourrait être un off-target du shMPV17 ayant pour conséquence le phénotype de faible prolifération dans le cas où le shMPV17 constitutif est produit de manière plus importante. Une autre approche pour déterminer lequel de ces deux phénotypes est représentatif de ce qu'il se passe lorsque MPV17 est réprimé, sera d'utiliser d'autres shMPV17 possédant une séquence différente des shMPV17 précédemment utilisés et ciblant d'autres séquences de l'ARNm de MPV17. Dans le cas où un phénotype de faible prolifération dans les cellules silencées pour MPV17 est confirmé ou dans



## DISCUSSION

---

le cas où il y aurait toujours un doute sur le phénotype exact, une approche supplémentaire sera de restaurer l'expression de MPV17 afin de vérifier si le taux de prolifération est rétabli dans des cellules silencées pour MPV17.



## V. BIBLIOGRAPHIE



- Akhurst, R.J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 790–811.
- Ameri, K., and Harris, A.L. (2008). Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 14–21.
- Arnould, T., Michel, S., and Renard, P. (2015). Mitochondria Retrograde Signaling and the UPR mt: Where Are We in Mammals? *Int. J. Mol. Sci.* 16, 18224–18251.
- Avdulov, S., Li, S., Michalek, V., Burrichter, D., Peterson, M., Perlman, D.M., Manivel, J.C., Sonenberg, N., Yee, D., Bitterman, P.B., et al. (2004). Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* 5, 553–563.
- Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S.J.H., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* (80-. ). 351, 728–733.
- Binder, C.J., Weiher, H., Exner, M., and Kerjaschki, D. (1999). Glomerular Overproduction of Oxygen Radicals in Mpv17 Gene-Inactivated Mice Causes Podocyte Foot Process Flattening and Proteinuria. *Am. J. Pathol.* 154, 1067–1075.
- Blakely, E.L., Butterworth, A., Hadden, R.D.M., Bodi, I., He, L., McFarland, R., and Taylor, R.W. (2012). MPV17 mutation causes neuropathy and leukoencephalopathy with multiple mtDNA deletions in muscle. *Neuromuscul. Disord.* 22, 587–591.
- Bottani, E., Giordano, C., Civiletto, G., Di Meo, I., Auricchio, A., Ciusani, E., Marchet, S., Lamperti, C., D’Amati, G., Viscomi, C., et al. (2014). AAV-mediated liver-specific MPV17 expression restores mtDNA levels and prevents diet-induced liver failure. *Mol. Ther.* 22, 10–17.
- Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: Key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer* 7, 495–507.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 50–83.
- Casalena, G., Krick, S., Daehn, I., Yu, L., Ju, W., Shi, S., Tsai, S. -y., D’Agati, V., Lindenmeyer, M., Cohen, C.D., et al. (2014). Mpv17 in mitochondria protects podocytes against mitochondrial dysfunction and apoptosis in vivo and in vitro. *AJP Ren. Physiol.* 306, F1372–F1380.
- Dalla Rosa, I., Cámara, Y., Durigon, R., Moss, C.F., Vidoni, S., Akman, G., Hunt, L., Johnson, M.A., Grocott, S., Wang, L., et al. (2016). MPV17 Loss Causes Deoxynucleotide Insufficiency and Slow DNA Replication in Mitochondria. *PLoS Genet.* 12.
- Dallabona, C., Marsano, R.M., Arzuffi, P., Ghezzi, D., Mancini, P., Zeviani, M., Ferrero, I., and Donnini, C. (2010). Sym1, the yeast ortholog of the MPV17 human disease protein, is a stress-induced bioenergetic and morphogenetic mitochondrial modulator. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1098–1107.
- Dang, C. V. (1999). c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1–11.
- Deans, T.L., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2007). A Tunable Genetic Switch Based on RNAi and Repressor Proteins for Regulating Gene Expression in Mammalian Cells. *Cell* 130, 363–372.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., De Longueville, F., Boffe, S., et al. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J. Cell Sci.* 118, 743–758.
- Derynck, R., and Miyazono, K. (2008). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family. *{TGF} $\beta$  Fam.* 29–43.



- El-Hattab, A.W., and Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA Depletion Syndromes: Review and Updates of Genetic Basis, Manifestations, and Therapeutic Options. *Neurotherapeutics* 10, 186–198.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Whitehouse, L.L., and Livingston, D.M. (1993). TGF $\beta$  inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74, 1009–1020.
- Fabregat, I., Moreno-Càceres, J., Sánchez, A., Dooley, S., Dewidar, B., Giannelli, G., and ten Dijke, P. (2016). TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *FEBS J.* 2219–2232.
- Feng, X.H., Lin, X., and Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J.* 19, 5178–5193.
- Ferrari, G., Lamantea, E., Donati, A., Filosto, M., Briem, E., Carrara, F., Parini, R., Simonati, A., Santer, R., and Zeviani, M. (2005). Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA. *Brain* 128, 723–731.
- Frederick, J.P., Liberati, N.T., Waddell, D.S., Shi, Y., and Wang, X. (2004). Transforming growth factor  $\beta$ -mediated transcriptional repression of c- myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive smad binding element. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2546–2559.
- Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.
- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I.H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis, E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L.A., et al. (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 14134–14139.
- Garone, C., Rubio, J.C., Calvo, S.E., Naini, A., Tanji, K., DiMauro, S., Mootha, V.K., and Hirano, M. (2012). MPV17 Mutations Causing Adult-Onset Multisystemic Disorder With Multiple Mitochondrial DNA Deletions. *Arch. Neurol.* 69, 1648.
- Griffiths, A., Miller, J., and Suzuki, D. (2000). Introduction to Genetic Analysis. 7th edition.
- Hakonen, A.H., Isohanni, P., Paetau, A., Herva, R., Suomalainen, A., and Lönnqvist, T. (2007). Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain* 130, 3032–3040.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619–633.
- Hashemi, A., Roohvand, F., Ghahremani, M.H., Aghasadeghi, M.R., Vahabpour, R., Motevali, F., and Memarnejadian, A. (2012). Optimization of transfection methods for Huh-7 and Vero cells: A comparative study. *Cytol. Genet.* 46, 347–353.
- Heldin, C.H., Vanlandewijck, M., and Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS Lett.* 586, 1959–1970.
- Huang, J.J., and Blobel, G.C. (2016). Dichotomous roles of TGF- $\beta$  in human cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1441–1454.
- Huggins, C.J., Mayekar, M.K., Martin, N., Saylor, K.L., Gonit, M., Jailwala, P., Kasoji, M., Haines, D.C., Quiñones, O.A., and Johnson, P.F. (2015). C/EBP $\gamma$  is a critical regulator of cellular stress response networks through heterodimerization with ATF4. *Mol. Cell. Biol.* 36, 693–713.
- Itoh, S., and ten Dijke, P. (2007). Negative regulation of TGF- $\beta$  receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 176–184.
- Ji, G.Z., Wang, X.H., Miao, L., Liu, Z., Zhang, P., Zhang, F.M., and Yang, J.B. (2006). Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with



- hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 12, 644–648.
- Johnson, R.J., Lovett, D., Lehrer, R.I., Couser, W.G., and Klebanoff, S.J. (1994). Role of Oxidants and Proteases in Glomerular Injury. *Kidney Int.* 45, 352–359.
- Joshi, S. (2014). Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World J. Biol. Chem.* 5, 321.
- Kanamaru, C., Yasuda, H., and Fujita, T. (2003). Involvement of Smad proteins in TGF $\beta$  and activin A-induced apoptosis and growth inhibition of liver cells. *Hepatol. Res.* 23, 211–219.
- Karasawa, M., Zwacka, R.M., Reuter, A., Fink, T., Hsieh, C.L., Lichter, P., Francke, U., and Welher, H. (1993). The human homolog of the glomerulosclerosis gene Mpv17: Structure and genomic organization. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1829–1834.
- Karkampouna, S., ten Dijke, P., Dooley, S., and Kruithof-de Julio, M. (2012). TGF $\beta$  Signaling in Liver Regeneration. *Curr. Pharm. Des.* 18, 4103–4113.
- Krauss, J., Astrinidis, P., Frohnhöfer, H.G., Walderich, B., and Nüsslein-Volhard, C. (2013). *transparent*, a gene affecting stripe formation in Zebrafish, encodes the mitochondrial protein Mpv17 that is required for iridophore survival. *Biol. Open* 2, 979–979.
- Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A.J., Wolfman, N.M., Ten Dijke, P., and Kuehn, M.R. (2001). Nodal signaling uses activin and transforming growth factor- $\beta$  receptor-regulated Smads. *J. Biol. Chem.* 276, 656–661.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079–3093.
- Ling, H. (2003). Therapeutic Role of TGF- $\beta$  Neutralizing Antibody in Mouse Cyclosporin A Nephropathy: Morphologic Improvement Associated with Functional Preservation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 377–388.
- Liu, I.M., Schilling, S.H., Knouse, K.A., Choy, L., Derynck, R., and Wang, X.F. (2009). TGF $\beta$ -stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGF $\beta$  switch. *EMBO J.* 28, 88–98.
- Löllgen, S., and Weiher, H. (2015). The role of the Mpv17 protein mutations of which cause mitochondrial DNA depletion syndrome (MDDS): Lessons from homologs in different species. *Biol. Chem.* 396, 13–25.
- Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 42–59.
- Lutful Kabir, F., Alvarez, C., and Bird, R. (2015). Canine Mammary Carcinomas: A Comparative Analysis of Altered Gene Expression. *Vet. Sci.* 3, 1.
- Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, a, Shalata, a, Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., et al. (2001). The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 29, 337–341.
- Massague, J. (2012). TGF beta signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630.
- Massagué, J. (1998). TGF beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753–791.
- Massagué, J. (2008). TGF $\beta$  in Cancer. *Cell* 134, 215–230.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–2810.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* 16.
- Meyer zum Gottesberge, A.M., Reuter, A., and Weiher, H. (1996). Inner ear defect similar to Alport's syndrome in the glomerulosclerosis mouse model Mpv17. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 253, 470–474.
- Michalopoulos, G.K. (1997). Liver Regeneration. *Science* (80-. ). 276, 60–66.
- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D., and Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clin. Cancer Res.* 18, 5546–5553.



- Moss, C.F., Dalla Rosa, I., Hunt, L.E., Yasukawa, T., Young, R., Jones, A.W.E., Reddy, K., Desai, R., Virtue, S., Elgar, G., et al. (2017). Aberrant ribonucleotide incorporation and multiple deletions in mitochondrial DNA of the murine MPV17 disease model. *Nucleic Acids Res.* 1–8.
- Mounolou, J.C., Jakob, H., and Slonimski, P.P. (1966). Mitochondrial DNA from yeast “petite” mutants: specific changes in buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 218–224.
- Müller, M., Smolders, J.W.T., Meyer zum Gottesberge, A.M., Reuter, A., Zwacka, R.M., Weiher, H., and Klinke, R. (1997). Loss of auditory function in transgenic Mpv17-deficient mice. *Hear. Res.* 114, 259–263.
- Nagahara, H., Ezhevsky, S. a, Vocero-Akbani, a M., Kaldis, P., Solomon, M.J., and Dowdy, S.F. (1999). Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E: cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14961–6.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J. Cell Biol.* 153, 1011–1021.
- O’Bryan, T., Weiher, H., Rennke, H.G., Kren, S., and Hostetter, T.H. (2000). Course of renal injury in the Mpv17-deficient transgenic mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 1067–1074.
- Palmieri, L., Agrimi, G., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Palmieri, F., and Walker, J.E. (2001). Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate. *J. Biol. Chem.* 276, 1916–1922.
- Pardali, K., and Moustakas, A. (2007). Actions of TGF- $\beta$  as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1775, 21–62.
- Parini, R., Furlan, F., Notarangelo, L., Spinazzola, A., Uziel, G., Strisciuglio, P., Concolino, D., Corbetta, C., Nebbia, G., Menni, F., et al. (2009). Glucose metabolism and diet-based prevention of liver dysfunction in MPV17 mutant patients. *J. Hepatol.* 50, 215–221.
- Pelton, R.W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H.L., and Gold, L.I. (1991). Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J. Cell Biol.* 115, 1091–1105.
- Proud, C.G. (2015). Mnk1, eIF4E phosphorylation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1849, 766–773.
- Reijns, M.A.M., Rabe, B., Rigby, R.E., Mill, P., Astell, K.R., Lettice, L.A., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, F., et al. (2012). Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell* 149, 1008–1022.
- Reinhold, R., Krüger, V., Meinecke, M., Schulz, C., Schmidt, B., Grunau, S.D., Guiard, B., Wiedemann, N., van der Laan, M., Wagner, R., et al. (2012). The channel-forming Sym1 protein is transported by the {TIM23} complex in a presequence-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 32, 5009–5021.
- Reuter, a, Nestl, a, Zwacka, R.M., Tuckermann, J., Waldherr, R., Wagner, E.M., Höyhty, M., Meyer zum Gottesberge, a M., Angel, P., and Weiher, H. (1998). Expression of the recessive glomerulosclerosis gene Mpv17 regulates MMP-2 expression in fibroblasts, the kidney, and the inner ear of mice. *Mol. Biol. Cell* 9, 1675–1682.
- Riedle, B., and Kerjaschki, D. (1997). Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am. J. Pathol.* 151, 215–231.
- Ross, S., Cheung, E., Petrakis, T.G., Howell, M., Kraus, W.L., and Hill, C.S. (2006). Smads



- orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *EMBO J.* 25, 4490–4502.
- Ruggero, D., Montanaro, L., Ma, L., Xu, W., Londei, P., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat. Med.* 10, 484–486.
- Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2003). All roads lead to ATF4. *Dev. Cell* 4, 442–444.
- Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S., and Elpeleg, O. (2001). Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat. Genet.* 29, 342–344.
- Schenkel, J., Zwacka, R.M., Rutenberg, C., Reuter, a, Waldherr, R., and Weiher, H. (1995). Functional rescue of the glomerulosclerosis phenotype in Mpv17 mice by transgenesis with the human Mpv17 homologue. *Kidney Int.* 48, 80–84.
- Selvakumar, T., Gjidoda, A., Hovde, S.L., and Henry, R.W. (2012). Regulation of Human RNA Polymerase III Transcription by DNMT1 and DNMT3a DNA Methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 287, 7039–7050.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700.
- Siddiqui, N., and Sonenberg, N. (2015). Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 763–772.
- Siegel, P.M., and Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–820.
- Spinazzola, A., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E., Carrara, F., D'adamo, P., Calvo, S., Marsano, R.M., Donnini, C., Weiher, H., Strisciuglio, P., et al. (2006). MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* 38, 570–575.
- Spinazzola, A., Invernizzi, F., Carrara, F., Lamantea, E., Donati, A., DiRocco, M., Giordano, I., Meznaric-Petrusa, M., Baruffini, E., Ferrero, I., et al. (2009). Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. In *Journal of Inherited Metabolic Disease*, pp. 143–158.
- Spurrier, B., Ramalingam, S., and Nishizuka, S. (2008). Reverse-phase protein lysate microarrays for cell signaling analysis. *Nat. Protoc.* 3, 1796–1808.
- Stamatakis, M., and Mantzaris, N. V. (2009). Comparison of deterministic and stochastic models of the lac operon genetic network. *Biophys. J.* 96, 887–906.
- Thenappan, A., Li, Y., Kitisin, K., Rashid, A., Shetty, K., Johnson, L., and Mishra, L. (2010). Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling and Expansion of Progenitor Cells in Regenerating Liver. *Hepatology* 51, 1373–1382.
- Thillainadesan, G., Chitilian, J.M., Iovic, M., Ablack, J.N.G., Mymryk, J.S., Tini, M., and Torchia, J. (2012). TGF- $\beta$ -Dependent Active Demethylation and Expression of the p15 ink4b Tumor Suppressor Are Impaired by the ZNF217/CoREST Complex. *Mol. Cell* 46, 636–649.
- Tian, M., and Schiemann, W.P. (2009). The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Futur. Oncol.* 5, 259–271.
- Trott, A., and Morano, K.A. (2004). SYM1 is the stress-induced *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the mammalian kidney disease gene Mpv17 and is required for ethanol metabolism and tolerance during heat shock. *Eukaryot. Cell* 3, 620–631.
- Trotter, P.J., Adamson, A.L., Ghrist, A.C., Rowe, L., Scott, L.R., Sherman, M.P., Stites, N.C., Sun, Y., Tawiah-Boateng, M.A., Tibbetts, A.S., et al. (2005). Mitochondrial transporters involved in oleic acid utilization and glutamate metabolism in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 442, 21–32.
- Uusimaa, J., Evans, J., Smith, C., Butterworth, A., Craig, K., Ashley, N., Liao, C., Carver, J.,



- Diot, A., Macleod, L., et al. (2014). Clinical, biochemical, cellular and molecular characterization of mitochondrial DNA depletion syndrome due to novel mutations in the MPV17 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 22, 184–191.
- Viscomi, C., Spinazzola, A., Maggioni, M., Fernandez-vizarra, E., Massa, V., Pagano, C., Vettor, R., Mora, M., and Zeviani, M. (2009). Early-onset liver mtDNA depletion and late-onset proteinuric nephropathy in Mpv17 knockout mice. *18*, 12–26.
- Vitvitsky, V., Prudova, A., Stabler, S., Dayal, S., Lentz, S.R., and Banerjee, R. (2007). Testosterone regulation of renal cystathionine beta-synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F594–600.
- Walker, C., and Streisinger, G. (1983). Induction of Mutations by gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos. *Genetics* 103, 125–136.
- Weiher, H., Noda, T., Gray, D.A., Sharpe, A.H., and Jaenisch, R. (1990). Transgenic mouse model of kidney disease: Insertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome. *Cell* 62, 425–434.
- Wong, D.T.W., Kim, J.J., Khalid, O., Sun, H.H., and Kim, Y. (2012). Double edge: CDK2AP1 in cell-cycle regulation and epigenetic regulation. *J. Dent. Res.* 91, 235–241.
- Wong, L.J.C., Brunetti-Pierri, N., Zhang, Q., Yazigi, N., Bove, K.E., Dahms, B.B., Puchowicz, M.A., Gonzalez-Gomez, I., Schmitt, E.S., Truong, C.K., et al. (2007). Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy. *Hepatology* 46, 1218–1227.
- Wu, R.H., Cheng, T.L., Lo, S.R., Hsu, H.C., Hung, C.F., Teng, C.F., Wu, M.P., Tsai, W.H., and Chang, W.T. (2007). A tightly regulated and reversibly inducible siRNA expression system for conditional RNAi-mediated gene silencing in mammalian cells. *J. Gene Med.* 9, 620–634.
- Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2002). c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 854–861.
- Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzén, P., Miyazono, K., and Heldin, C.H. (1994). Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 269, 20172–20178.
- Yamazaki, K., Masugi, Y., and Sakamoto, M. (2011). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: Altering transforming growth factor- $\beta$  signaling in hepatocarcinogenesis. In *Digestive Diseases*, pp. 284–288.
- Yang, M.H., Chen, C.L., Chau, G.Y., Chiou, S.H., Su, C.W., Chou, T.Y., Peng, W.L., and Wu, J.C. (2009). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 50, 1464–1474.
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L.S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D.N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Ron, D., and Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 29, 2082–2096.
- Yoo, Y.D., Choi, J.Y., Lee, S.J., Kim, J.S., Min, B.R., Lee, Y.I., and Kang, Y.K. (1999). TGF- $\beta$ -induced cell-cycle arrest through the p21(WAF1/CIP1)-G1 cyclin/CDKS-p130 pathway in gastric-carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 83, 512–517.
- Young, M.J., and Copeland, W.C. (2016). Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 38, 52–62.
- Zaret, K.S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: Lessons for stem-cell differentiation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 329–340.
- Zawel, L., Le Dai, J., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Kern, S.E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol.*



## BIBLIOGRAPHIE

---

Cell 1, 611–617.

Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. Cell Res. 19, 128–139.

Zwacka, R.M., Reuter, A., Pfaff, E., Moll, J., Gorgas, K., Karasawa, M., and Weiher, H. (1994). The glomerulosclerosis gene Mpv17 encodes a peroxisomal protein producing reactive oxygen species. EMBO J. 13, 5129–5134.